



Instituto Nacional de Innovación y
Transferencia en Tecnología Agropecuaria

ALCANCES TECNOLÓGICOS

REVISTA DEL INSTITUTO NACIONAL DE INNOVACIÓN Y TRANSFERENCIA EN TECNOLOGÍA AGROPECUARIA

VOLUMEN 15

NÚMERO 1

AÑO 2022



ANÁLISIS DE LA EMISIÓN DE METANO Y ÓXIDO NITROSO EN EL CULTIVO DE ARROZ EN COSTA RICA

Johnny Montenegro¹

RESUMEN

Análisis de la emisión de metano y óxido nitroso en el cultivo de arroz en Costa Rica. El sector arrocero costarricense tiene un rol muy importante en la seguridad alimentaria del país, pues abastece el 41 % del consumo nacional. Al igual que otros sectores, contribuye con la emisión de gases con efecto invernadero (GEI), razón por la cual es necesario analizar estas emisiones y determinar sus patrones, y con ello conocer variables que influyen su comportamiento. Esto es particularmente importante en el contexto actual con la formulación de un NAMA arroz que pretende realizar acciones de mitigación en esta actividad agrícola. Es por ello que el presente documento se desarrolló para determinar la evolución histórica de las emisiones de los gases antes mencionados que se generan durante el proceso productivo primario en el cultivo del arroz, y establecer la relación entre emisiones, la producción y el precio pagado al productor. Se estimaron las emisiones de CH₄ y N₂O que se han producido en el proceso productivo primario, tanto bajo el sistema de producción inundado como de secano desde 1990 y hasta el 2019. También se recopiló información estadística de área sembrada y rendimiento productivo por sistema de producción, precio pagado al productor por tonelada de arroz granza para el periodo antes referenciado. Se determinaron variaciones importantes en el área sembrada y en los rendimientos productivos, lo cual ha estado influenciados por el precio que recibe el productor. La emisión de CH₄ y de N₂O también fluctuaron en el tiempo como resultado de las variaciones en las áreas de siembra, lo cual generó variaciones en la eficiencia (t de CO₂eq t⁻¹ arroz granza) mostrando el precio pagado al productor ser modelador de la emisión, lo cual lo confirma la tendencia determinada en la relación entre la emisión y el valor bruto de la producción.

Palabras clave: cambio climático, metano, mitigación, óxido nitroso, valor de la producción.

ABSTRACT

The Costa Rican rice sector plays a very important role in the production of food for the country, and like different sectors, contributes with the emission of methane and nitrous oxide gases, which is why it is necessary to monitor these emissions now because this can allow the determination of patterns, and with it know variables that influence the determined trends. This is particularly important when formulating a rice NAMA that aims to carry out mitigation actions in this agricultural activity. That is why this document was developed to determine the historical evolution of emissions that are generated during the primary production process in

¹ Investigador en Cambio Climático y Agricultura, Convenio: Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Agropecuaria (INTA) – Instituto Meteorológico Nacional (IMN), Costa Rica. jmontenegro@imn.ac.cr, jmontenegro@inta.go.cr. Teléfono: (506) 2222-5616 / Fax: (506) 2223-1837. ORCID:0000-0001-8526-570X.

rice cultivation, and to establish its relationship with production and the price paid to the producer. The emissions of CH₄ and N₂O that have been produced in the primary production process were estimated since 1990 and up to 2019, both under flooded and rain fed production systems. Statistical information on the planted area and productive yield by production system, price paid to the producer per ton of rice, was also collected for the same period of time before mentioned. There were detected important variations in the planted area and in productive yields, which have been influenced by the price received by the producer. The emission of CH₄ and N₂O also fluctuated over time as a result of variations in the sowing areas, which generated variations in efficiency (t CO₂eq t⁻¹ rice) showing that the price paid to the producer being a modeler of the emission, which is confirmed by the trend determined in the relationship between the emission and the gross value of production.

Keywords: climate change, methane, mitigation, nitrous oxide, production value.

INTRODUCCIÓN

El sector arrocero costarricense tiene un rol muy importante en la producción de alimento para el país, y contribuye significativamente no solo en este aspecto, sino también con la seguridad socio-económica de un sector de la población al proporcionar empleos directos e indirectos.

El sector productivo primario, en el último año lo constituyeron aproximadamente 500 productores, de estos más del 75% tienen áreas menores a 50 ha y en conjunto producen menos del 20% de la cosecha nacional. La proporción del consumo nacional producido en el país fue de 41% en el 2020 (Conarroz 2020).

Este sector, al igual que otras actividades agropecuarias es afectado por el cambio climático, el cual se produce como resultado de la acumulación de gases con efecto invernadero (GEI) en la atmósfera. Existen diferentes fuentes de estos gases, por lo que el primer paso para la solución de esta problemática, es determinar cuáles actividades son las principales emisoras, ya que ello permite priorizar sectores y con ello desarrollar opciones de mitigación.

Costa Rica al igual que los países firmantes de la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre Cambio Climático (CMNUCC), efectúa periódicamente inventarios nacionales de gases con efecto invernadero (GEI), que incluyen los sectores determinados por el Panel Intergubernamental en Cambio Climático (IPCC, por sus siglas en inglés), entre los que se encuentra el sector agropecuario. Sin embargo, estos datos son puntuales y para años específicos, y para el caso específico

del cultivo del arroz, la información reportada no proporciona de manera detallada cambios anuales en la emisión que se podrían suceder por las condiciones variantes que influyen en esta actividad productiva.

De acuerdo con el más reciente Inventario de GEI, el cual se realizó para el 2017 (MINAE 2021), la emisión del cultivo del arroz en equivalentes de CO₂ representó 7,5% del sector agropecuario, y 1,6 % del total de la emisión nacional; si se considera la emisión neta, el sector arrocero representó en el 2015 el 2,0% del total nacional.

El peso relativo que este sector tiene en las emisiones del país es importante, y por ello es necesario dar seguimiento a las emisiones de GEI, esto permite la determinación de patrones, y conocer las variables que influyen el comportamiento determinado. Este proceso es muy importante por cuanto permitirá de manera más técnica desarrollar opciones de mitigación para el sector arrocero, reduciendo la emisión de GEI en el cultivo del arroz, logrando con ello un producto más amigable con el ambiente y sostenible.

El sector arrocero consiente de esta situación, ha decidido participar activamente para contribuir a la solución de la problemática global del cambio climático y apoyar la Política Nacional mencionada mediante su participación activa en la formulación del NAMA arroz. El presente documento pretende apoyar ambas iniciativas con la generación y análisis de información que permita tener más clara la situación de este sector y las emisiones GEI.

No existe a la fecha en Costa Rica, documento alguno que muestre la tendencia de las emisiones provenientes del sector primario del cultivo del arroz, por lo que basado en lo anterior, los objetivos de esta investigación fueron:

determinar la evolución histórica de las emisiones GEI que se generan durante el proceso productivo primario en el cultivo del arroz, y establecer la relación de estas con la producción y el precio pagado al productor.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recopilación de información

El análisis desarrollado se realizó desde 1990 y hasta el 2019. Para esta investigación se utilizaron estadísticas de área sembrada de arroz, tanto en seco como inundado, así como de producción de arroz en granza, limpia y seca, reportada por la Corporación Arrocera Nacional (CONARROZ) en diferentes informes anuales. También se utilizó el Boletín Agropecuario de la Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria (SEPSA), para complementar la información productiva. Con estos datos se calculó la productividad.

De la misma fuente (Conarroz) se obtuvo el precio por tonelada de arroz granza, limpia y seca en colones corrientes pagado al productor, solo que en este caso los datos accesados se inician en el 2003.

Otra información económica utilizada se limitó exclusivamente al valor bruto de la producción (VBP) de arroz, los datos en colones encadenados al 2012 fueron proporcionados por SEPSA con datos del Banco Central, mientras que del Boletín Agropecuario de SEPSA, el VBP en colones corrientes.

Cálculo de la emisión de gases con efecto invernadero

Para estimar la emisión de metano (CH_4) y óxido nítrico (N_2O) provenientes del suelo (en adelante referenciados como gases con efecto invernadero, GEI) cultivado con el arroz, se utilizaron los factores de emisión disponibles, resultado de investigaciones nacionales (Montenegro y Abarca 2001) y sugeridos por el IPCC (2006). En este proceso se utilizó el mismo procedimiento empleado para estimar la emisión reportada

en el Inventario Nacional de Gases con Efecto Invernadero y que se detalla en las guías metodológicas del IPCC (2006).

Los resultados anteriores y para cada gas se transformaron a dióxido de carbono equivalente (CO_2eq) de acuerdo con los valores establecidos por la Convención Marco para el Cambio Climático de las Naciones Unidas (CMCCNU).

Eficiencia de emisión

Para calcular la eficiencia de emisión (cantidad de gas CO_2eq emitido por unidad de arroz producido, también conocida como intensidad de la emisión), se totalizó el CO_2eq de todas

las fuentes, misma que se dividió entre el total de toneladas producidas. De manera que se logró obtener un valor de emisión en t de $\text{CO}_2\text{eq t}^{-1}$ de arroz granza producido.

Límites y limitaciones del estudio

Esta evaluación se desarrolló considerando exclusivamente las emisiones de GEI en la finca provenientes de la fertilización nitrogenada en arroz de secano, y el metano del arroz inundado.

Con respecto a las limitaciones, no se dispone de información detallada de variaciones en las dosis de fertilizante aplicadas, entre años y entre productores, razón por la cual se utiliza una cantidad constante de 80 kg de nitrógeno ha⁻¹ ciclo⁻¹ de cultivo (Tinoco y Acuña 2009). No se incluyen las emisiones que provengan de la aplicación, terrestre o aérea, de agroquímicos a las plantaciones.

Debido a que no se dispone con el cambio de uso del suelo en el tiempo, este análisis no incluyó las emisiones y absorciones provenientes del potencial cambio de uso del suelo que haya podido ocurrir en el tiempo, es decir, aquellas originadas por la transformación de áreas forestales o de otras actividades agropecuarias a terrenos dedicados a la siembra de arroz. Tampoco se considera el cambio que podría estar ocurriendo con el carbono orgánico del suelo ya que no se dispone de este tipo de información.

Manejo estadístico de los datos

Con los datos disponibles se procedió a realizar figuras para mostrar tendencias y se realizaron análisis de correlación entre diferentes variables: producción, productividad, valor de la producción y, emisión por tipo de gas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aspectos productivos

Área cultivada

El área sembrada de arroz, tanto en secano como inundado, ha variado a través del tiempo (figura 1). En el caso del área bajo inundación, esta ha representado en promedio 35% del total sembrado desde 1990 y hasta el 2019, con variaciones anuales que van del 21 al 48% del total. El área total sembrada mostró su menor valor en el 2019 (33.049 ha) y el mayor en el 2010 con 81.116 ha.

Se pueden observar tres secciones, correspondientes cada una a una década (90's, 00's, y 10's); en la primera de ellas existió la tendencia al incremento del área sembrada (figura 1) En la siguiente década, el área de secano presentó tendencia clara al incremento, algo que no sucedió con la de inundación. Finalmente, la tercer década es clara, el área de siembra disminuye de manera significativa en ambos sistemas de producción (figura 1).

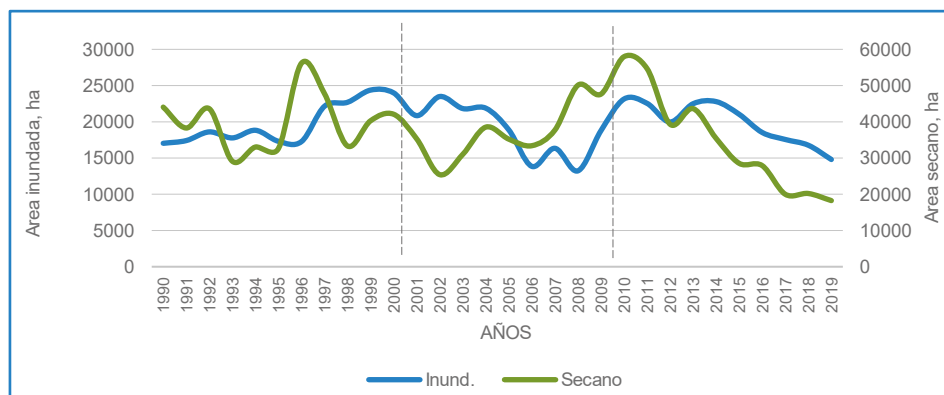


Figura 1. Área, ha, sembrada de arroz inundado y en secano. Costa Rica.

Producción y productividad

La variación en el área sembrada (figura 1) se manifestó en la producción total obtenida, sin que haya una clara relación entre esta y la productividad cuando se observa el periodo analizado de manera grupal (figura 2). Sin embargo, cuando se analizan los datos por década, la situación es más clara (figura 3) y muestra que la productividad cambia ligeramente con la producción.

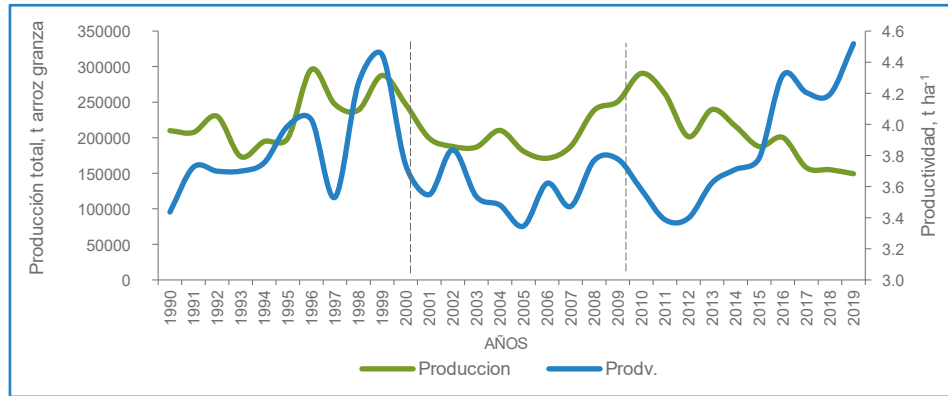


Figura 2. Producción total, t, y productividad, t ha⁻¹, de arroz en granza. Costa Rica.

En las décadas de los 90's y 00's (figuras 3a y 3b), aunque sin significancia estadística, existe tendencia a que el incremento de la producción está ligada al mejoramiento de la productividad, sin embargo, en la última década es claro que la tendencia se revierte (figura 3c).

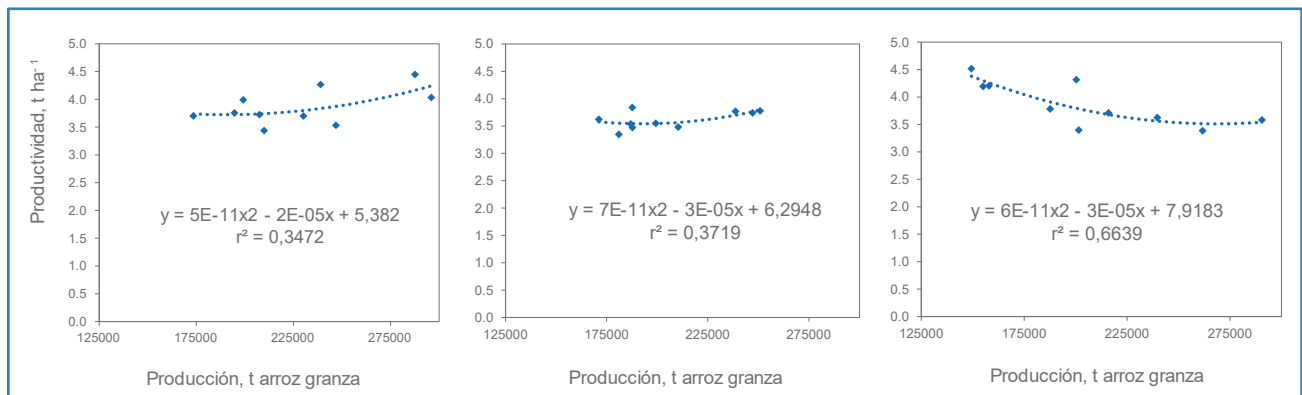


Figura 3. Relación entre la producción total de arroz en granza, t, y la productividad, t⁻¹ ha, según década. Costa Rica.

Esas tendencias están ligadas al precio por tonelada de arroz en granza seca y limpia que recibieron los productores. En colonias corrientes, los precios se incrementaron del 2003 al 2010 (figura 4), lo cual estimuló a los productores particularmente a los de secano, quienes aumentaron las áreas sembradas durante la década del 00 (figura 1), sin que ello se manifestara claramente en la productividad (figura 3b).

En la última década el precio se ha mantenido relativamente estable (figura 4), lo cual, sin duda no estimula la siembra de este grano, y por el contrario ha mostrado clara tendencia a la disminución (figura 1) y que se manifiesta también en la producción total obtenida (figura 2) y se observó en la productividad (figura 3c). Sin duda el precio que reciben los productores es uno de los grandes modeladores de esta actividad.

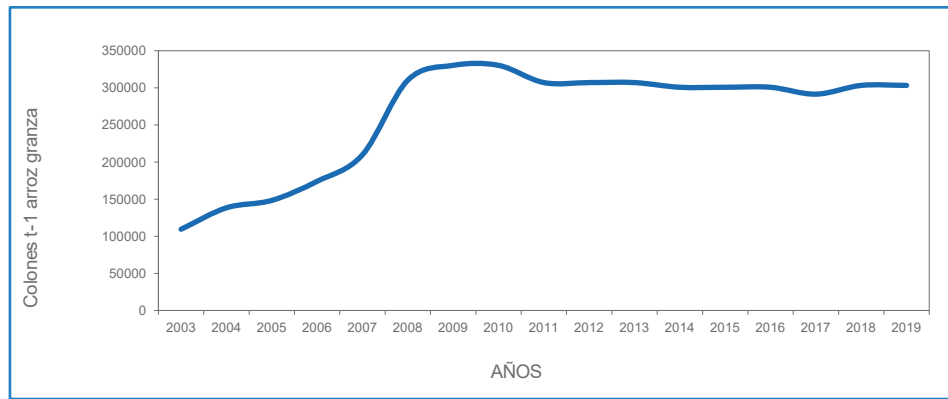


Figura 4. Precio pagado al productor, colones corrientes, por tonelada de granza limpia y seca. Costa Rica.

Emisión de gases con efecto invernadero (GEI)

Metano y óxido nitroso

La emisión de CH_4 y de $\text{N}_2\text{O-N}$ han fluctuado (figura 5) como resultado de las variaciones que se han producido en las áreas de siembra (figura 1). Las mayores emisiones de metano suceden en los años donde el área sembrada en inundación fue la más grande (1999, 2010 y 2014), mientras que las del $\text{N}_2\text{O-N}$ se presentaron en 1996, 2010 y el 2011 cuando se observaron las mayores áreas sembradas en secano (figura 1).

Por otra parte, es clara la disminución de la emisión de ambos gases que ocurre en la década del 2010 (figura 5), la cual es resultado de la reducción de las áreas de siembra, tanto en secano como bajo inundación (figura 1).

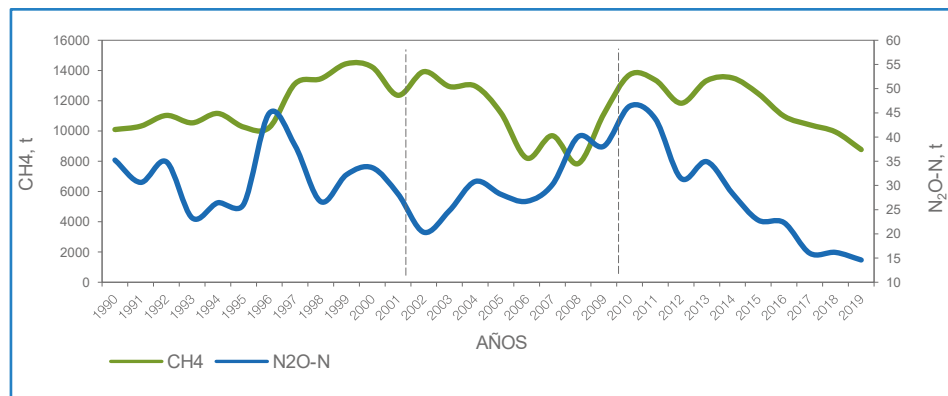


Figura 5. Emisión de metano y óxido nitroso, t, proveniente del cultivo de arroz anegado y secano. Costa Rica.

Emisión total

La emisión total de GEI, en equivalentes de CO₂, desde 1990 y hasta el 2019 muestra grandes fluctuaciones con diferentes tendencias en el tiempo (figura 6) como resultado de las variaciones en el área sembrada (figura 1). La primera parte de la década de los 90's fue relativamente estable con valores promedio anual de 236,4 Gg, valor que posteriormente se incrementa a 306,0 Gg. A mediados de la siguiente década se reduce la emisión a valores promedio anual de 195,9 Gg, para volver a incrementarse a 218,3 Gg a finales de la década del 2000.

Después del 2010, se presenta tendencia a la baja (figura 6), siendo el promedio anual de esta última década de 262,0 Gg, aunque el valor para el 2019 fue de 191,3 Gg similar a los observados en el 2006 y 2008 (figura 6).

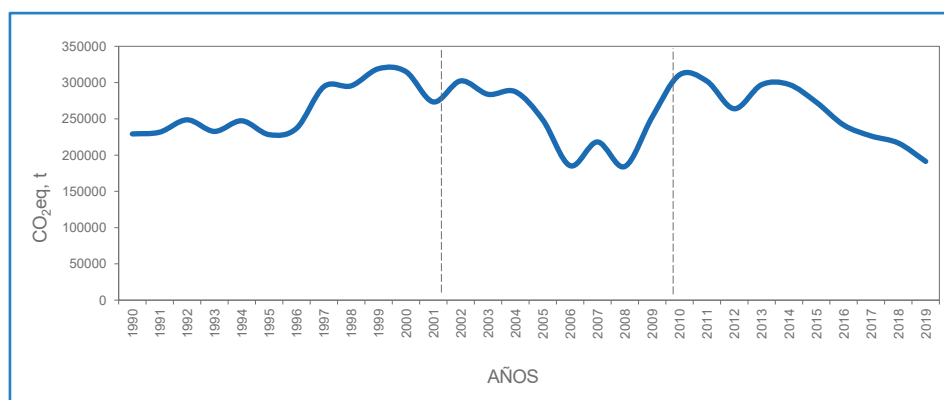


Figura 6. Emisión total GEI, t CO₂eq, desde 1990 en el cultivo de arroz. Costa Rica.

La importancia relativa de la emisión del cultivo del arroz, con respecto a la emisión nacional neta reportada en los diferentes inventarios nacionales de gases con efecto invernadero que se han realizado en el país, varía entre 2,5 y 4,0%; la relación es inferior (del 2,0 al 2,8%) si se considera la emisión bruta.

En su estudio de análisis de ciclo de vida en el cultivo del arroz, Muhammadi *et al.* (2014) determinaron entre 828 y 1806 kg de CO₂eq ha⁻¹, valores que son inferiores al estimado en esta investigación.

Relaciones

En este apartado se analiza la emisión en función del área sembrada, la producción y, el valor bruto de la producción.

Emisión y área sembrada

La emisión GEI, en t de CO₂eq ha⁻¹, no mostró relación alguna con el área sembrada de arroz en las décadas del 90 y 00 (figura 7a y 7b). Sin embargo, si se determinó correlación positiva ($P < 0,00012$) para la última década (figura 7c). La razón de este comportamiento se debe a que durante las dos primeras décadas el área sembrada de arroz inundado y seco, en términos generales, mostraron comportamiento inverso, es decir mientras una se reducía la otra se incrementaba (figura 1). Esta situación cambió en la última década donde ambas áreas se redujeron (figura 1) y ello condujo a la reducción de la emisión (figura 6), y se muestra claramente la relación directa entre área sembrada y emisión (figura 7c).

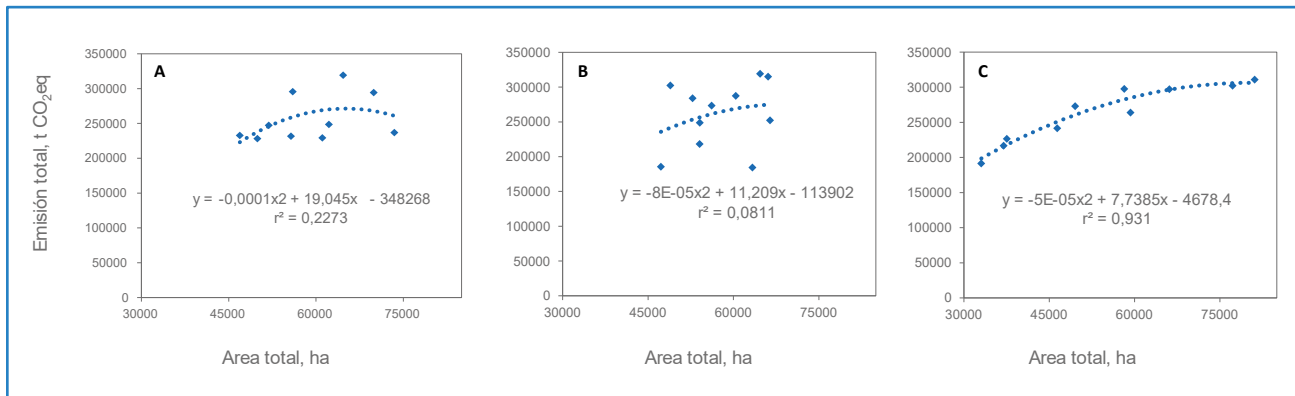


Figura 7. Relación entre el área total sembrada de arroz, ha, y la emisión GEI, t⁻¹ CO₂eq según década. Costa Rica.

Cuando se considera solamente la emisión proveniente de la fertilización nitrogenada utilizada en el sistema de arroz seco, el valor promedio fue de 206 ± 43 kg de CO₂eq ha⁻¹, el cual es inferior a lo reportado en estudios de Andrade, Campo y Segura (2014) y González, Méndez e Izquierdo (2014), quienes también determinaron que la emisión derivada de esta práctica constituye el mayor porcentaje de la emisión total.

Emisión de CO₂eq y producción de arroz

La relación entre la emisión y la producción total de arroz presenta un promedio anual de $1,2 \pm 0,2$ t de CO₂eq t⁻¹ de arroz granza, con fluctuaciones en el tiempo (figura 8) como resultado de las variaciones de la producción (figura 2) y del área sembrada en seco e inundado (figura 1).

El valor más alto de esta relación se observó en el 2002; ello se explica porque si bien en ese año no se determinó la mayor emisión (figura 6), si se presentó una de las producciones más bajas (figura 2). Con respecto a los valores bajos, los menores se determinaron en 1996 y en el 2008. Ello está determinado por la baja proporción de

área sembrada bajo inundación (figura 1) y la alta producción y productividad lograda en esos años (figura 2).

En la década del 90, la relación mostró estabilidad inicial para fluctuar posteriormente hasta 1996, año a partir del cual se incrementa hasta finales de esa década. La siguiente década mostró que a partir del 2002 y hasta el 2008 se mejoró sustancialmente esta relación al pasar la emisión de 1,6 a 0,8 t de CO₂eq t⁻¹ arroz granza. A partir de ese año, la relación nuevamente se incrementa (figura 8).

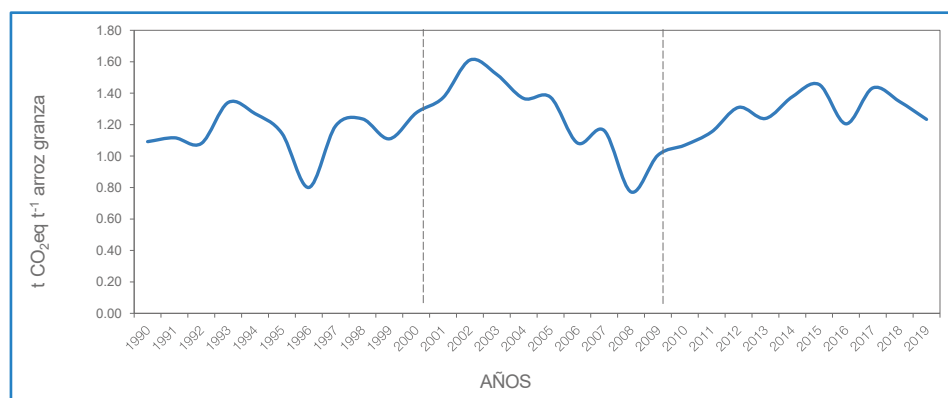


Figura 8. Eficiencia histórica de la emisión, t CO₂eq t⁻¹ arroz en granza, en Costa Rica.

El valor promedio de la eficiencia de emisión durante el período analizado fue de $1,23 \pm 0,19$ kg de $\text{CO}_2\text{eq kg}^{-1}$ de arroz granza, siendo muy similar al determinado en el 2019 (figura 8).

Por otra parte, se determinó correlación significativa ($P < 0,0022$) entre la producción anual de arroz granza y la emisión de CO_2eq (figura 9A),

la cual muestra que la emisión se incrementa conforme la producción aumenta. En términos promedio, el cambio observado es el incremento de $0,34$ t CO_2eq por cada tonelada de arroz granza, aunque es claro que con las mayores producciones la emisión tiende a estabilizarse (figura 9A).

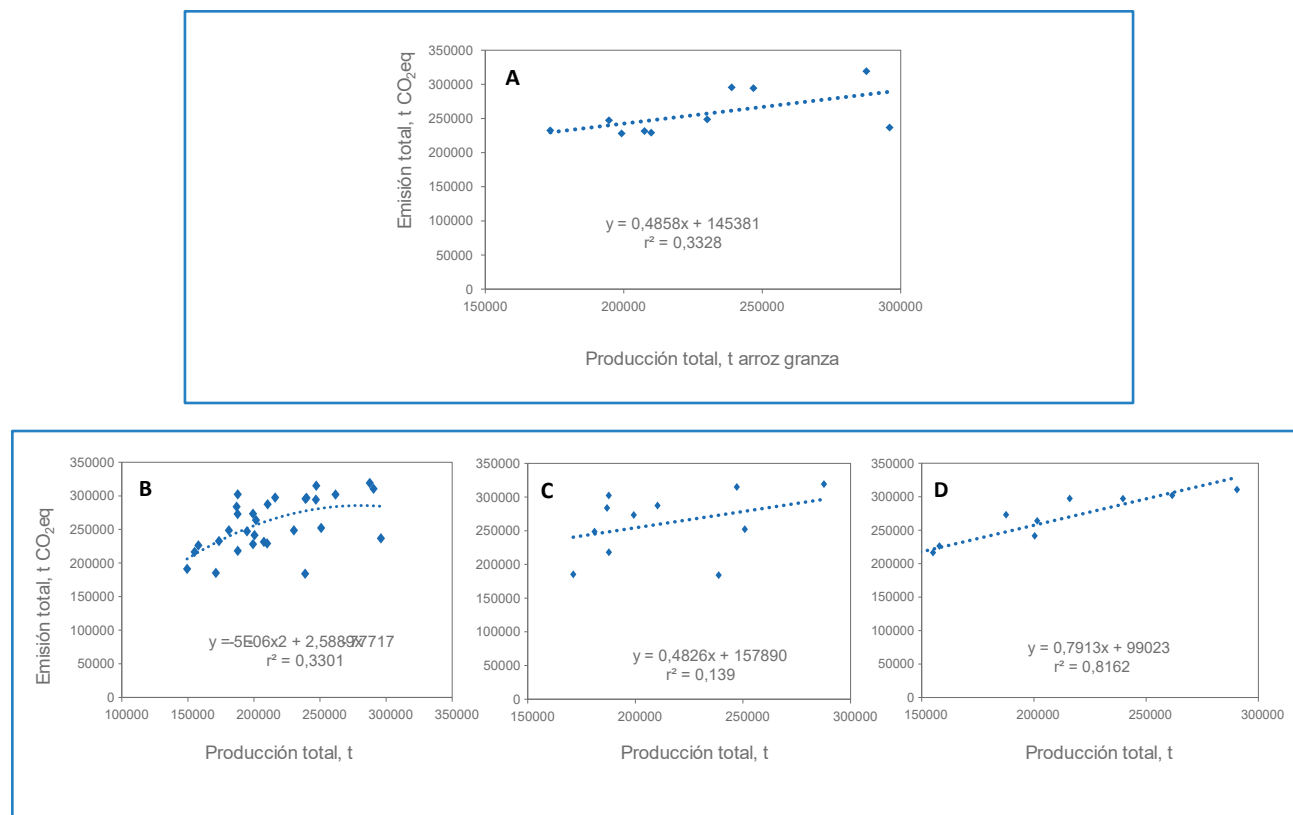


Figura 9. Relación entre la producción total de arroz en granza, t, con la emisión de $\text{CO}_2\text{eq t}^{-1}$. Costa Rica.

En términos decadales (figuras 9b-d), a pesar de que en todas las décadas la tendencia es al incremento lineal de la emisión con la producción, únicamente la última de ellas mostró ser significativa (figura 9d).

Productividad y emisión en CO_2eq .

La productividad mostró correlación significativa con la emisión para las décadas del 90 y del 10, con tendencia polinómica, siendo en la primera positiva (figura 10a), mientras que negativa la otra (figura 10c), es decir en los 90's, a mayor productividad mayor emisión, lo cual fue contrario en la década del 2010. Esto es el resultado del mejoramiento en el manejo de las áreas sembradas

para hacerlas más productivas, lo cual ha sido la respuesta del productor para lograr mantenerse en la actividad dado la estabilidad de precios en los últimos años (figura 4).

La década del 2000 no mostró relación alguna entre las variables mencionadas (figura 10b).

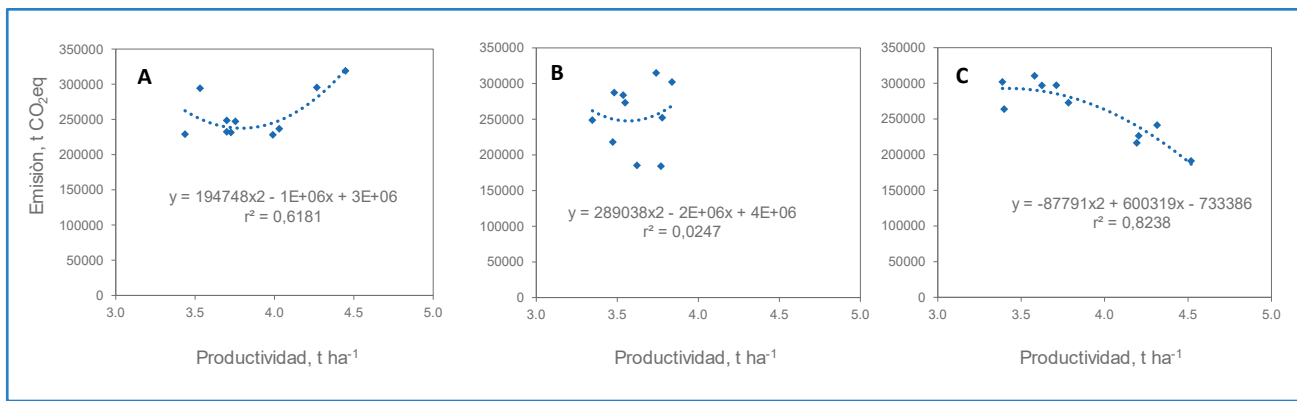


Figura 10. Relación entre la productividad, t de arroz en granza ha⁻¹, con la emisión de CO₂eq, t⁻¹. Costa Rica.

Emisión y valor bruto de la producción

Cuando se relaciona la emisión GEI con el valor bruto de la producción **en colones constantes** del 2012, se observan fluctuaciones en el tiempo, y con cierta tendencia a incrementarse en los últimos años sin llegar al valor determinado a inicios de la década de los 90's (figura 11). La tendencia es polinómica y muestra cómo se redujo la emisión por millón de colones hasta el 2010, año a partir del cual se estabiliza con cierto incremento a finales de la siguiente década (figura 11). El valor más bajo de esta relación se estimó en el 2008, año donde se determinó una de las menores emisiones (figura 6) y un buen precio en recibido por los productores (SEPSA 2020).

En el caso del valor bruto de la producción **en colones corrientes**, la figura es clara, mostrándose a partir del 1993 una disminución importante de la emisión por millón de colones, para estabilizarse a partir del 2008 (figura 11) como resultado del precio recibido por los productores, el cual no se ha incrementado desde el 2009 (figura 4). En este sentido es coincidente la reducción de la emisión por millón de colones con el incremento del precio que ocurrió desde el 2003 y hasta el 2009 (figura 4). Esto demuestra el efecto moderador que tiene el precio en esta relación.

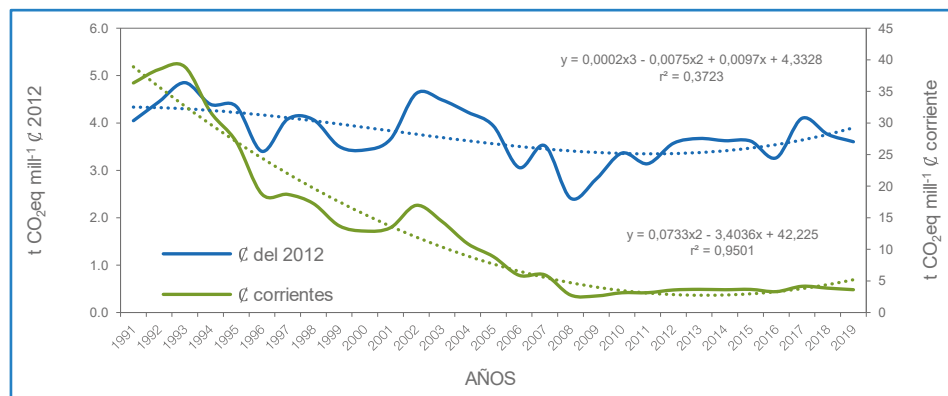


Figura 11. Relación entre la emisión de CO₂eq y el valor bruto de la producción de arroz en colones corrientes y constantes del 2012. Costa Rica.

Algunas opciones de mitigación de GEI en el cultivo de arroz

Diferentes acciones de mitigación pueden ser desarrolladas para reducir las emisiones de metano y óxido nítrico en este cultivo, y seguidamente menciono algunas.

Una de las primeras acciones a realizar es la ejecución de trabajos de campo para cuantificar, de acuerdo con el manejo actual del cultivo y las variedades más comúnmente utilizadas, la emisión de GEI. Con ello será posible actualizar los valores utilizados como factores de emisión y en consecuencia, reducir el grado de incertidumbre asociado con la estimación de la emisión nacional en la actividad arrocera.

De igual forma, esfuerzos deben realizarse para estimar los potenciales cambios que se podrían estar presentado en el carbono orgánico del suelo bajo este cultivo, tanto en el sistema bajo inundación como en seco.

Un aspecto a considerar es la implementación de diferentes prácticas y técnicas que permitan reducir las emisiones tanto del CH_4 como del N_2O al mismo tiempo que se continúe desarrollando el proceso productivo con iguales o mejores rendimientos. Ello tendrá un impacto positivo en esta actividad.

En este sentido diferentes investigaciones muestran resultados promisorios con la utilización de técnicas para mitigar las emisiones GEI durante el proceso productivo primario. Algunos de ellos han enfocado la utilización de variedades con baja emisión de metano (Gogoi *et al.* 2008, Jiang *et al.* 2017) y muestran como nuevas variedades de arroz altamente productoras pueden reducir significativamente la emisión de metano.

El manejo del agua es otra técnica que ha sido evaluada con el propósito de mitigar las emisiones de metano. En este sentido Tyagi, Kumari y Singh (2009) al igual que Islam *et al.* (2020) mostraron que la continua inundación produce mayor cantidad de metano que cuando se aplica drenaje en diferentes etapas de crecimiento del cultivo.

Investigaciones realizadas por Thammasom, Vityakon y Saenjan (2016) muestran como el potencial Redox está relacionado con la

metanogénesis y, en consecuencia, con la emisión de este gas, por lo que el manejo de esta variable muestra potencial para mitigación en la producción de arroz anegado.

La reducción de la incorporación de residuos vegetales previo a la preparación del suelo para la siembra del arroz ha sido uno de los aspectos mencionados en diferentes trabajos de investigación (Thammasom, Vityakon y Saenjan 2016, Wang *et al.* 2017) como una forma de mitigar tanto la emisión de metano como de óxido nítrico.

La utilización de inhibidores de la nitrificación y estrategias de fertilización nitrogenada también pueden mitigar las emisiones de N_2O y aumentar el rendimiento de granos y la eficiencia del uso de nitrógeno en condiciones de arroz de siembra directa (Gaihre *et al.* 2020).

La aplicación de una o varias de las opciones mencionadas, sin que sean las únicas, podrían contribuir de manera significativa en la mitigación de GEI generados en el proceso productivo primario y contribuir decididamente a la consecución de la meta de neutralidad tanto para esta actividad como para el país.

La emisión de GEI provenientes del proceso productivo primario del cultivo del arroz mostró variaciones en el tiempo como resultado de cambios en el área total sembrada, y por el área dedicada a cada sistema de producción, lo cual influye directamente en el tipo de GEI generado. Ello hace variar la importancia relativa de la emisión de este cultivo con respecto al total neto nacional, promediando en los últimos cuatro inventarios nacionales 3,2%.

La relación de la emisión con la producción es directa y positiva, y lineal en cada una de las décadas analizadas, así que conforme se incrementa la producción también lo hace la emisión. En el caso de la productividad, esta mostró un comportamiento bastante interesante al ser positiva la correlación con la emisión en la década del 90, pero negativa la del 2010.

Por otra parte, el precio que recibe el productor por su cosecha es el principal

modelador de la eficiencia económica de la emisión, la cual mostró clara tendencia a la baja cuando se expresa en colones corrientes; la misma relación no fue tan clara cuando se utilizan colones constantes del 2012.

Finalmente, diferentes opciones de mitigación podrían implementarse en la producción primaria de este grano, lo cual sin duda mejoraría los valores de las distintas relaciones consideradas.

LITERATURA CITADA

- CONARROZ (Corporación Arrocera Nacional). 2020. Informe anual 2020. Centro estadístico arrocerero. 39 p.
- CONARROZ (Corporación Arrocera Nacional). 2019. Informe estadístico período 2018/2019. 59 p.
- CONARROZ (Corporación Arrocera Nacional). 2018. Informe estadístico período 2017/2018. 57 p.
- CONARROZ (Corporación Arrocera Nacional). 2017. Informe estadístico período 2016/2017. 54 p.
- CONARROZ (Corporación Arrocera Nacional). 2016. Informe estadístico período 2015/2016. 54 p.
- CONARROZ (Corporación Arrocera Nacional). 2015. Informe estadístico período 2014/2015. 55 p.
- CONARROZ (Corporación Arrocera Nacional). 2014. Informe estadístico período 2013/2014. 53 p.
- CONARROZ (Corporación Arrocera Nacional). 2013. Informe estadístico período 2012/2013. 56 p.
- CONARROZ (Corporación Arrocera Nacional). 2012. Informe estadístico período 2011/2012. 58 p.
- CONARROZ (Corporación Arrocera Nacional). 2011. Informe estadístico período 2010/2011. 55 p.
- CONARROZ (Corporación Arrocera Nacional). 2010. Informe estadístico período 2009/2010. 52 p.
- Gaihre, Y; Singh, U; Bible, W; Fugice, J; Sanabria, J. 2020. Mitigating N₂O and NO emissions from direct-seeded rice with nitrification inhibitor and urea deep placement. *Rice Science*, 27(5):434-444.
- Gogoi, N; Baruah, K.K. & Gupta, P.K. 2008. Selection of rice genotypes for lower methane emission. *Agron. Sustain. Dev.* 28, 181-186.
- Islam, M; Kanta, Y; Islam, R; Akter, M; Al Mahmud, M; Singh, U; Ole, B. 2020. Effects of water management on greenhouse gas emissions from farmers' rice fields in Bangladesh. *Science of The Total Environment*, 734(10):139382
- Jiang, Y; Van Groenigen, K; Huang S; Hungate, B; Van Kessel, C; Hu, S; Zhang, J; Wu, L; Yan, X; Wang, L; Chem, J; Hang, X; Shang, Y; Horwath, W; Ye, R; Linqvist, B; Song, Z; Deng, A; Zhang, W. 2017. Higher yields and lower methane emissions with new rice cultivars. *Global Change Biology*, 23(11):4728-4738.
- SEPSA (Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria). Boletín estadístico agropecuario No. 27. 2017. 218 p.
- SEPSA (Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria). Boletín estadístico agropecuario No. 25. 2014. 188 p.
- SEPSA (Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria). Boletín estadístico agropecuario No. 21. 2011. 182 p.
- SEPSA (Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria). Boletín estadístico agropecuario No. 17. 2007. 74 p.
- SEPSA (Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria). Boletín estadístico agropecuario No. 15. 2004. 58 p.
- SEPSA (Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria). Boletín estadístico agropecuario No. 13. 2002. 34 p.
- SEPSA (Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria). Boletín estadístico agropecuario No. 11. 2000. 30 p.

SEPSA (Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria). Boletín estadístico agropecuario No. 9. 1998. 28 p.

Thammasom, N; Vityakon, P; Saenjan, P. 2016. Response of methane emissions, redox potential, and pH to eucalyptus biochar and rice straw addition in a paddy soil. Songklanakarin J. Sci. Technol., 38(3):325-331.

Tinoco, R; Acuña, A. 2009. Cultivo de arroz (*Oryza sativa*). Manual de recomendaciones técnicas. INTA. 78 p.

Tyagi, L; Kumari, B; Singh, S. 2009. Water management - A tool for methane mitigation from irrigated paddy fields. Science of The Total Environment 408(5):1085-1090.

Wang, C; Lai, D; Sardans, J; Wang, W; Zeng, C; Peñuelas, J. 2017. Factors related with CH₄ and N₂O emissions from a paddy field: Clues for management implications. PLoSONE 12(1):e0169254.

ASOCIO DEL ÁCIDO OXÁLICO Y PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN EL PROCESO INFECTIVO DE LA BACTERIA *Burkholderia glumae* EN EL CULTIVO DE ARROZ (*Oryza sativa*)

Ing. Luis Vargas Cartagena¹

RESUMEN

Asocio del ácido oxálico y peróxido de hidrógeno en el proceso infectivo de la bacteria *Burkholderia glumae* en el cultivo de arroz (*Oryza sativa*). El estudio se realizó en el Laboratorio de Fitoprotección del Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA) entre los meses de abril y septiembre del año 2018. El objetivo fue determinar la importancia del ácido oxálico y el peróxido de hidrógeno en el proceso infectivo de *Burkholderia glumae* en la fase vegetativa (follaje) y reproductiva (panículas) del arroz. Los resultados obtenidos evidenciaron que se logró determinar en forma indirecta, mediante la inoculación de varias cepas de *B. glumae* en hojas de café, el rompimiento del tejido celular del follaje debido a la liberación de ácido oxálico. La incidencia en el daño mecánico osciló entre 50% y 100% por el envés de la hoja y de 6.25% a 56.25% por el haz de la hoja. Los análisis de refracción de rayos X elaborados a través de microscopía electrónica de barrido identificaron la presencia de cristales de calcio, con valores obtenidos entre 3.8 y 4 KeV (Electronvoltios) los cuales provenían del asocio del ácido oxálico liberado por la bacteria en adición con las moléculas de calcio del sustrato artificial empleado. Se obtuvo una modificación del sustrato artificial tradicional empleado para el crecimiento de bacterias del género *Pseudomonas* spp, el cual consistió en la adición de peptona a base de sólidos de leche (10g / 500ml de agua destilada estéril), a fin de proporcionar el elemento calcio e inducir a la bacteria a la producción de cristales de oxalato de calcio. Los tratamientos con aplicaciones individualizadas de ácido oxálico sintético y peróxido de hidrógeno sintético al 2% mostraron síntomas coincidentes con los daños inducidos por la bacteria en condiciones naturales. La mezcla de ambas sustancias (ácido oxálico + peróxido de hidrógeno) evidenció aún más la similitud con los síntomas que desarrolla la bacteria en condiciones naturales. Los resultados logrados evidencian la importancia que tienen ambas toxinas en el proceso de patogénesis de *Burkholderia glumae* en el cultivo de arroz y la necesidad de realizar estudios para la búsqueda de sustancias supresoras o inhibidoras de estas toxinas en pro de su empleo en planes de manejo integrado de esta bacteria.

Palabras clave: Patogenicidad, ácido oxálico, peróxido de hidrógeno, concentraciones, *Burkholderia glumae*

Keywords: Pathogenicity, oxalic acid, hydrogen peroxid, concentrations, *Burkholderia glumae*

¹ Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria, INTA - Costa Rica. lvargasc@inta.go.cr. Sede de Laboratorio de Servicios de Fitoprotección del INTA. Sabana Sur, San José.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad del añublo bacterial de la panícula del arroz es inducida por la bacteria *Burkholderia glumae* y se caracteriza por afectar severamente el llenado del grano. Se reportó por primera vez en Japón en la década de los 50, luego fue diseminada entre los años 1995 y 1996 en China, Taiwán, Corea, India, Filipinas y Tailandia. En Colombia se identificó en el año 1987 con bajos niveles de incidencia, en el año 1996 se reportó en los arrozales de Luisiana en los Estados Unidos y en Panamá en el año 2006 (Prado, 2010). La bacteria no produce pigmento fluorescente en el medio de cultivo BDKing, es gram negativa y posee entre uno a tres flagelos. En orden de importancia y bajo las condiciones agroclimáticas de Costa Rica, dentro de los síntomas que provoca en el cultivo del arroz se destacan los siguientes: 1- Panícula erecta, 2- Decoloración, manchado y vaneamiento de la panícula, 3- Manchado de las espiguillas de color cafezusco a pajizo, 4- En planta adulta, decoloración de la vaina de la hoja bandera, 5- En el follaje, lesiones ligeramente irregulares de color pajizo y rodeadas de un borde café, del borde de la hoja hacia adentro, esto en condiciones de alta incidencia y 6- En la plántula, pudrición de aspecto acuoso en el tallo y la hoja.

La presencia de la enfermedad se ve favorecida por altas temperaturas nocturnas (28°C), altas temperaturas diurnas (32-38°C) y alta humedad relativa (> 80%) (Mew, 1992). La enfermedad se ve favorecida por el uso de altas concentraciones de nitrógeno y se disemina por salpique de lluvia con vientos fuertes y contacto de planta a planta. La bacteria infecta la semilla y puede crecer epifíticamente en el tejido de las plantas a bajas concentraciones hasta la emergencia de la panícula, en donde invade los espacios entre las células de la epidermis externa y el parénquima esponjoso del lema, caracterizado por tener paredes celulares delgadas (Mew, 1992).

Los factores de virulencia que destacan a este patógeno son: la producción de la toxina toxoflavina, producción de enzimas lipasas y catalasas y la formación de flagelos (Rush, *et al.* 2010). Muchos autores mencionan la importancia de la toxina toxoflavina como un agente crítico en la infección de la bacteria (Sato *et al.* 1989;

Ham *et al.* 2011; Jeong *et al.* 2003; Florez y Uribe 2011; Latuasan y Berends 1961; Matsuda y Sato 1988; Shingu y Yoneyama 2004; Suzuki *et al.* 2004 y Iiyama *et al.* 1995). Pocos autores hacen mención del ácido oxálico en la bacteria *Burkholderia glumae* (Nakata y He 2010; Kato, *et al.* 2013; Kato, *et al.* 2014 y Oh, *et al.* 2014).

Otros autores hacen mención de la presencia de oxalatos (ácido oxálico) en microorganismos en general; tales como hongos y bacterias, interviniendo en factores relacionados con la protección hacia ambientes alcalinos (Dutton y Evans 1996, Sayer y Gadd 1997, Appanna y Hamel 1999; Green y Clausen 2003), como factor de virulencia (Duttons y Evans 1996; Hegedus y Rimmer 2005) en la viabilidad de las células (Lambert y Nakata 2016) y obtención de nutrientes (Shimada *et al.* 1994; Dutton y Evans 1996; Ghareeb, 2000 y Munir *et al.* 2001).

En este estudio se realizaron una serie de pruebas en orden cronológico con la finalidad de responder a los siguientes objetivos: 1- Determinar si *Burkholderia glumae* induce lesiones en hojas de café (*Coffea arabica*) producto de la liberación de ácido oxálico, 2- Determinar si hay formación de cationes de calcio asociados a la producción de ácido oxálico, 3- Desarrollar un sustrato artificial para favorecer la producción de ácido oxálico en la bacteria *Burkholderia glumae*, 4- Evaluar diferentes concentraciones de ácido oxálico y peróxido de hidrógeno y su efecto sobre espigas y follaje de arroz y 5- Evaluar el efecto solo y combinado de una concentración determinada de ácido oxálico y peróxido de hidrógeno sobre las panículas de arroz.

MATERIALES Y MÉTODOS

Inoculación de la bacteria *B. glumae* en hojas de café para determinar su efecto

Se estableció un ensayo en hojas de café (*Coffea arabica*) sobre las cuales se inoculó una masa compacta o “moquillo” de la bacteria *Burkholderia glumae* a una concentración aproximada de 1×10^8 unidades formadoras de colonias (ufc) / ml. Se depositó el moquillo en ocho puntos de inoculación tanto en el haz como en el envés de la hoja de café y el control fue hojas con solo el depósito de agua destilada estéril (figura 1). Se emplearon en forma aleatoria cinco cepas de la bacteria provenientes del Banco de Microorganismos del Laboratorio de Fitoprotección del INTA (INTA B3, INTA B19, INTA B20, INTA B21 e INTA B47). Las hojas se depositaron dentro de platos petri de vidrio grandes

(14,5 cm diámetro x 3 cm alto) con papel toalla, debidamente esterilizados. Luego se dejaron en condiciones semi-controladas en un área ventilada, con luz indirecta sobre mesas de laboratorio a una temperatura promedio de 24°C. Se empleó un diseño irrestricto al azar para cada punto de la hoja inoculada (haz y envés), compuesto por seis tratamientos y dos repeticiones. Se determinó la incidencia de daño mecánico sobre la epidermis de la hoja a los 4, 8 y 12 días después de la inoculación (ddi). Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza y separación de medias según prueba DMS al 5%, utilizando el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis Systems, 2002).

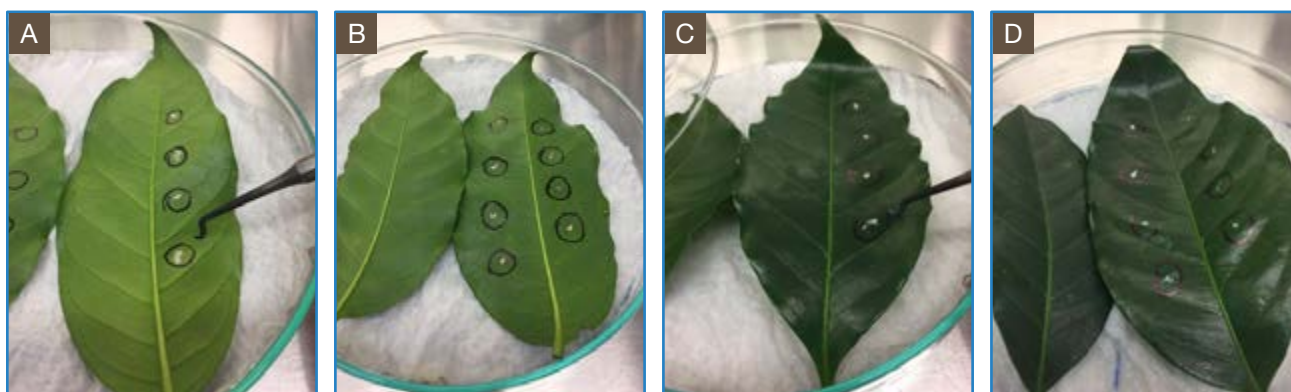


Figura 1. Proceso de inoculación del moquillo de la bacteria *Burkholderia glumae* sobre hojas de café. (A-B): envés de la hoja, (C-D): haz de la hoja. Laboratorio de Fitoprotección / INTA. San José, Costa Rica. 2018.

Determinación de cristales de oxalato de calcio producidos por *B. glumae*

Para el crecimiento de *Burkholderia glumae* se implementó el sustrato artificial BDK a base de peptona, pero proveniente de sólidos de leche, el cual suministra calcio dentro de su composición (cuadro 1). Para el crecimiento exponencial de la bacteria se utilizó este medio, pero sin agar (medio líquido) en un volumen de 30 ml y se sometió durante 48 horas en agitación a 115 rpm en un agitador horizontal modelo SI-1600

Orbital Genie. Luego, a fin de obtener un sedimento de posibles cristales de oxalato de calcio se procedió a un centrifugado por 10 minutos a 3500 rpm con la adición de ácido acético al 5%; volviendo a centrifugar por duplicado el sedimento con agua destilada estéril a 3500 rpm. La determinación de calcio se realizó mediante la técnica de análisis elemental por energía dispersiva de rayos X (EDX), con un detector de la marca IXRF

Systems, acoplado a un microscopio electrónico de barrido Hitachi S3700N del Centro de Investigaciones en Estructuras Microscópicas de la Universidad de Costa Rica (UCR). Se determinó los picos de calcio utilizando el software Iridium Ultra, basado en el valor de energía en kilo electrón voltio (KeV), el cual es específico para cada elemento y está representado en el eje X del espectrograma.

Cuadro 1. Sustrato artificial BDK con peptona de sólidos de leche para el crecimiento de *Burkholderia glumae*. Laboratorio de Fitoprotección / INTA. San José, Costa Rica. 2018.

Componente	Cantidad en 500 ml de agua destilada estéril
Peptona de sólidos de leche (Ca) CAS: 73049-73-7	10g
Agar	8g
Glicerol o glicerina (C ₃ H ₈ O ₃)	8ml
Fosfato ácido dipotásico (K ₂ HPO ₄)	0.75g
Sulfato de magnesio heptahidratado (Mg SO ₄ 7H ₂ O)	0.75g

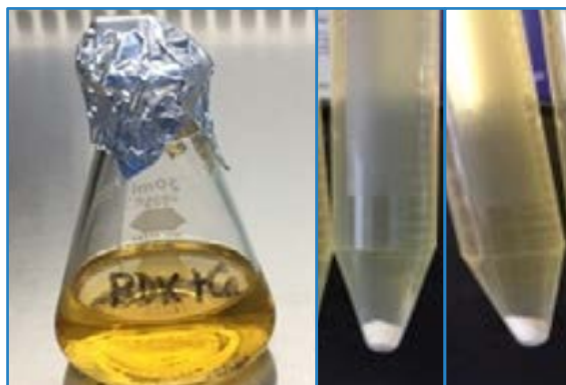


Figura 2. Sustrato líquido BDK con peptona de sólidos de leche y suspensión de posibles cristales de oxalato de calcio. Laboratorio de Fitoprotección / INTA, San José, Costa Rica. 2018.

Prueba de inoculación con ácido oxálico

Para esta prueba se tomaron secciones de lámina foliar, espiguillas y panículas de arroz de la variedad INTA PUITÁ y se utilizaron cuatro concentraciones de ácido oxálico (1%, 1.5%, 2.0% y 2.5%). Para el caso del follaje se depositaron 10 gotas / lámina foliar y para las espiguillas, una gota / espiguilla. Cada gota estuvo compuesta de 0.1 ml de ácido oxálico, en ambos casos la inoculación se realizó con la ayuda de un inyector (jeringa de insulina). Para el control se realizó el mismo procedimiento con agua destilada estéril. (figuras 3 y 4). La inoculación del ácido oxálico en las panículas se realizó mediante frotación con pinceles previamente esterilizados, de manera que quedara adherido en la superficie de las espiguillas. El material inoculado se dejó en un área ventilada, con luz indirecta sobre mesas de laboratorio a una temperatura promedio de 24°C.

Para cada uno de los sistemas de inoculación se empleó un diseño irrestricto al azar compuesto por cinco tratamientos y dos repeticiones. Se determinó la incidencia de daño mecánico ejercido por el ácido oxálico sobre las hojas y espiguillas y la severidad para el caso de las panículas. Para la evaluación de la severidad en la panícula se empleó la escala que se describe en el Cuadro 2. Las evaluaciones se realizaron 1 y 4 días después de la inoculación (ddi).

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza y separación de medias según prueba DMS al 5%, utilizando el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis Systems, 2002).

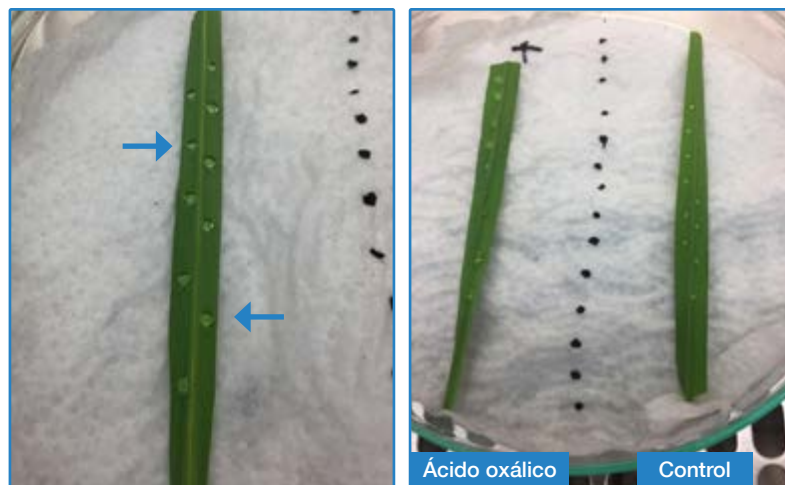


Figura 3. Depósito de gotas de ácido oxálico (flechas) sobre el follaje de arroz. Laboratorio de Fitoprotección / INTA. San José, Costa Rica. 2018.

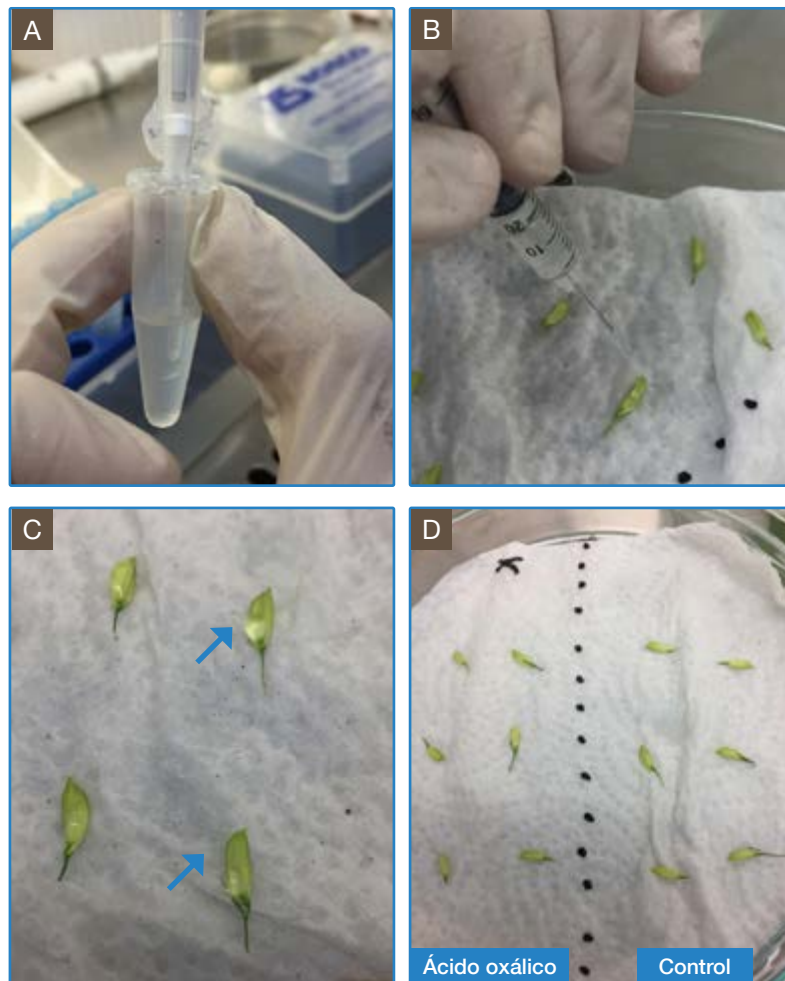


Figura 4. Ácido oxálico sobre las espiguillas de arroz. (A): Elaboración de la concentración. (B-D): Depósito del ácido oxálico sobre las espiguillas (flechas). Laboratorio de Fitoprotección. San José, Costa Rica. 2018.

Prueba de inoculación con peróxido de hidrógeno

Para esta prueba se utilizaron seis concentraciones de peróxido de hidrógeno (0,5%, 1,0%, 1,5%, 2,0%, 2,5% y 3,0%). Se empleó la misma técnica de inoculación para el follaje indicada en la prueba anterior con el ácido oxálico. También se procedió a inocular panículas por medio de pinceles previamente esterilizados, el procedimiento fue el de frotar uniformemente las espiguillas de las panículas con el peróxido de hidrógeno. Las muestras inoculadas se colocaron en un área ventilada, con luz indirecta sobre mesas de laboratorio a una temperatura promedio de 24°C.

Se empleó un diseño irrestricto al azar compuesto por siete tratamientos dos repeticiones para cada método de inoculación. Dos días después de la inoculación (ddi), se determinó la incidencia de daño mecánico ejercido por el peróxido de hidrógeno sobre las hojas y la severidad ejercida en las panículas. Para la evaluación de la severidad en la panícula se empleó la escala que se describe en el Cuadro 2.

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza y separación de medias según prueba DMS al 5%, utilizando el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis Systems, 2002).

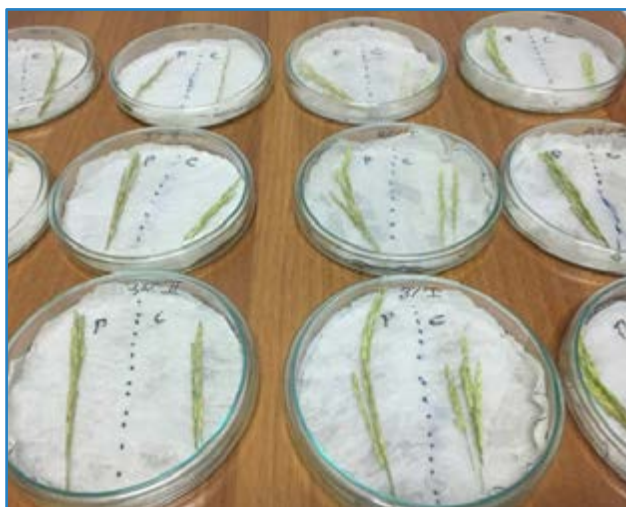
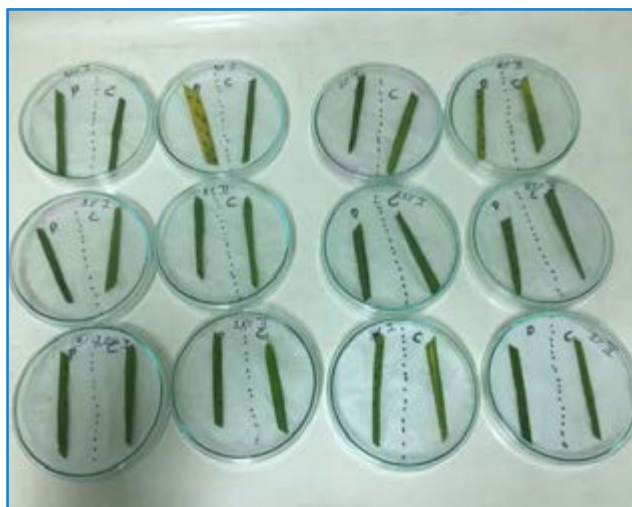


Figura 5. Panorámica del montaje de la prueba con las concentraciones de peróxido de hidrógeno en hojas y panículas. Laboratorio de Fitoprotección / INTA. San José, Costa Rica. 2018.

Prueba de inoculación con ácido oxálico + peróxido de hidrógeno + *Burkholderia glumae*

En esta prueba se inoculó sobre panículas de arroz previo a la antesis, el ácido oxálico al 2%, el peróxido de hidrógeno al 2%, la mezcla de ácido oxálico + peróxido de hidrógeno (ambos al 2%), la bacteria *Burkholderia glumae* a una concentración de 1.0×10^8 UFC (Unidades Formadoras de Colonias) y el control constituido por agua destilada estéril. Para la aplicación se empleó un aerógrafo marca Master Airbrush modelo VC16-W22 y se atomizó 1 ml / panícula. El material inoculado con el ácido oxálico y el peróxido de hidrógeno se

colocó bajo condiciones de laboratorio en un área ventilada con luz indirecta y a una temperatura promedio de 24°C. Las muestras inoculadas con la bacteria *B. glumae* se incubaron por 48 horas a 40 °C en una incubadora Isotemp 1601D (Fisher Scientific).

Se empleó un diseño irrestricto al azar con cinco tratamientos y cuatro repeticiones. Se determinó la severidad a 2 y 48 horas después de la inoculación (hdi) por medio de una escala de evaluación.

Cuadro 2. Escala de Evaluación del Añublo Bacterial de la Panícula (*Burkholderia glumae*). Laboratorio de Fitoprotección / INTA. San José, Costa Rica. 2018.

GRADO	DESCRIPCIÓN
0	Ausencia de enfermedad
1	1% - 10% de área afectada en panícula
2	11% - 25% de área afectada en panícula
3	26 - 50 % de área afectada en panícula
4	51% - 75% de área afectada
5	76% - 100% de área afectada

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza y separación de medias según prueba MS al 5%, utilizando el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis Systems, 2002).

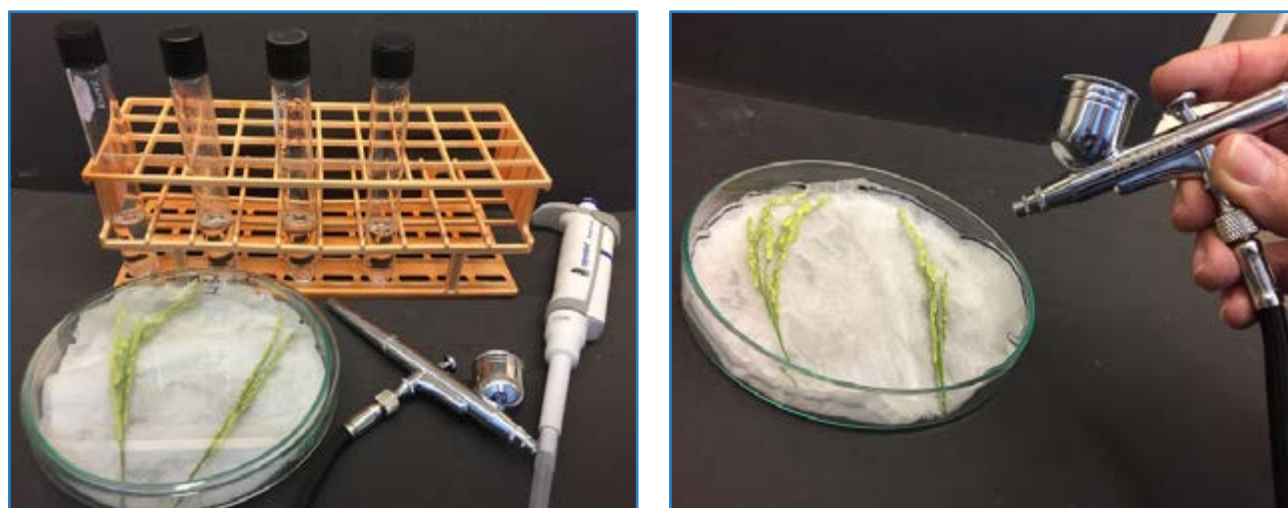


Figura 6. Materiales empleados y atomizo mediante el uso del aerógrafo. Laboratorio de Fitoprotección / INTA. San José, Costa Rica. 2018.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inoculación de *Burkholderia glumae* en hojas de café para determinar su efecto

Los resultados obtenidos evidenciaron que el depósito del “moquillo” de la bacteria sobre las hojas de café degradó en forma parcial el tejido o pared celular de la hoja de café. Dicho efecto fue más notorio por el envés de la hoja, debido a la carencia de cera epicuticular en esta zona y a la presencia de más estomas, en comparación con el haz de la hoja (cuadro 3).

Respecto de las evaluaciones, se observó que doce días después de la inoculación las cepas identificadas como INTA B-3 e INTA B-19 afectaron en un 100% el tejido de las hojas por el envés, mientras que con las otras tres cepas de la bacteria la incidencia del daño osciló entre 50% y 87,5%. En el testigo con agua el tejido no presentó ningún tipo de daño. En cuanto a las

inoculaciones por el haz de las hojas, los resultados obtenidos mostraron que las incidencias de los daños por cada una de las cepas a los 12 ddi fueron más bajas que las presentadas en el envés y oscilaron entre 6,25% y 56,25%. Tampoco se presentó daño alguno en el tejido en las inoculaciones del testigo con agua.

Haciendo una comparación entre cepas y aunque no es del interés de este trabajo, es importante recalcar que la cepa INTA B-3 presentó el mayor efecto patogénico sobre las hojas de café, puesto que a partir de los 4 ddi tanto por el haz como por el envés ya se presentaban grados de afectación en el los puntos inoculados.

El objetivo de haber realizado estas inoculaciones es atribuido a la presencia de cristales de forma variada (bipiramidales y amorfos) sobre el tejido afectado de arroz (espiguillas), pero fundamentalmente su formación en sustratos artificiales de crecimiento para bacterias enriquecidos con calcio. Esto sugiere que probablemente esta bacteria produzca una toxina conocida como ácido oxálico (oxalato), tal como lo han reportado varios autores en trabajos realizados con otros microorganismos. Esta sustancia o toxina les sirve a ciertos microorganismos como medio de protección hacia ambientes alcalinos, como factor de virulencia, le da viabilidad a las células y les ayuda en la obtención de nutrientes (Rao y Tewari 1987;

Rao y Tewari 1988; Nakata y He 2010; Lambert y Nakata 2016). Para el caso del estudio, el interés es dilucidar si esta toxina es producida por la bacteria *B. glumae* como factor de virulencia.

En la enfermedad del café (*Coffea arabica*) conocida como “ojo de gallo” e inducida por el hongo *Mycena citricolor*, se ha identificado el ácido oxálico como una toxina no específica, la cual inicia el proceso infectivo y de penetración en el tejido foliar, por medio del rompimiento y degradación de la cera epicuticular, el hongo secuestra el calcio de los pectatos de la pared celular, lo cual facilita el ingreso del patógeno en el tejido del hospedero (Tewari 1990).

Para el caso del presente trabajo el moquillo depositado sobre las hojas de café estaba conformado por millones colonias bacterianas de *B. glumae*, las cuales en conjunto liberan el ácido oxálico y rompen el tejido foliar de la hoja de café. En algunas lesiones inducidas se formaron masas blanquecinas alrededor de la lesión y fueron identificadas como masas de cristales. En este caso en particular, el ácido oxálico producido y liberado logró entrar en contacto con el calcio interno de la hoja de café, formando cristales de oxalato de calcio (figura 7). Lo cual fue corroborado mediante la observación directa de dichos cristales en un microscopio de luz y coincidente con los resultados obtenidos por Rao y Tewari (1987).

Cuadro 3. Incidencia en la formación de daño tisular en hoja de café inducido por la liberación de ácido oxálico de *Burkholderia glumae*. Laboratorio de Fitoprotección. San José, Costa Rica. 2018

CEPA DE BACTERIA	INCIDENCIA DE DAÑO MECÁNICO EN HOJA DE CAFÉ*					
	HAZ			ENVÉS		
	4 ddi	8 ddi	12 ddi	4 ddi	8 ddi	12 ddi
INTA B3	31.25 (a)	43.75 (a)	56.25 (a)	87.50 (a)	100 (a)	100 (a)
INTA B19	0.00 (b)	0.00 (b)	25.00 (ab)	75.00 (ab)	93.75 (ab)	100 (a)
INTA B20	0.00 (b)	0.00 (b)	12.50 (b)	68.75 (abc)	68.75 (ab)	87.50 (ab)
INTA B21	0.00 (b)	0.00 (b)	12.50 (b)	31.25 (cd)	31.25 (cd)	50.00 (b)
INTA B47	0.00 (b)	0.00 (b)	6.25 (b)	43.75 (bc)	62.50 (bc)	62.50 (ab)
Control	0.00 (b)	0.00 (b)	0.00 (b)	0.00 (d)	0.00 (d)	0.00 (c)

*= Columnas con igual letra no difieren estadísticamente según prueba DMS 5%



Figura 7. Incidencia de daño tisular en hoja de café (haz y envés) inducido por la liberación de ácido oxálico de *Burkholderia glumae*. (A-B): Haz, (C-D): Envés, (E-F): Formación de conglomerados de cristales (flechas). Laboratorio de Fitoprotección / INTA. San José, Costa Rica. 2018.

Formación de cristales de oxalato de calcio por la bacteria *B. glumae*

El crecimiento exponencial de *B. glumae* favorecido mediante agitación horizontal del medio líquido junto con el sustrato de peptona de sólidos de leche, indujo a altas concentraciones de la bacteria a liberar de igual manera altas concentraciones de ácido oxálico, el cual al combinarse con el elemento calcio proporcionado en el medio, desencadenó en la formación de abundantes cristales de oxalato de calcio. Este comportamiento también se vio reflejado en el sustrato artificial sólido (figura 8). El análisis por Refracción de Rayos X en la determinación de cationes de calcio reveló que la suspensión de cristales previamente

obtenida efectivamente correspondió a cationes de Calcio (figura 9). Kim *et al.* (2010), en un estudio sobre la participación y ocurrencia de *B. glumae* en Korea, mencionan que la colonia bacteriana se cubría completamente de cristales, los cuales definieron, erróneamente como “cristales de toxoflavina”. Estos resultados evidencian la presencia de la toxina ácido oxálico en esta bacteria fitopatógena del cultivo del arroz, además de su otra toxina, la toxoflavina. Cada una por separado o en conjunto, podrían estar tomando acción como dos importantes factores de virulencia de la bacteria.

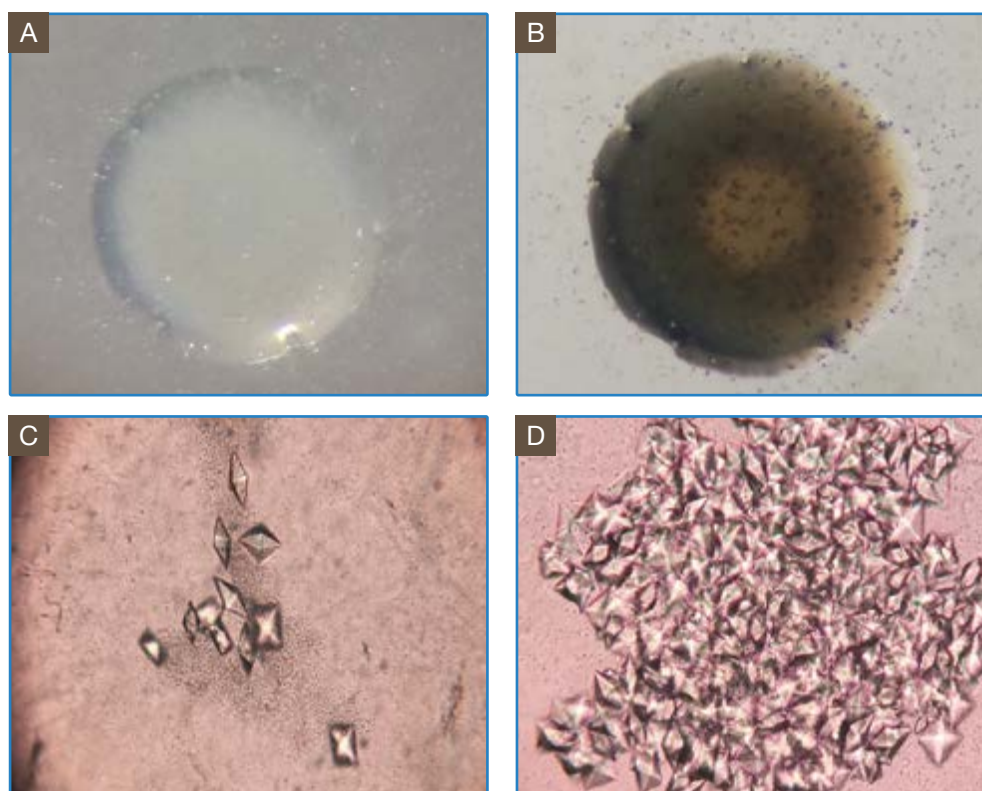


Figura 8. (A): Colonia de *B. glumae* vista con luz reflejada, (B): Misma colonia vista con luz transmitida, obsérvese la formación de cristales de oxalato de calcio dentro y fuera de la colonia, (C-D): Cristales y células bacterianas en el medio líquido a base de peptona de sólidos de leche. Laboratorio de Fitoprotección / INTA. San José, Costa Rica. 2018.

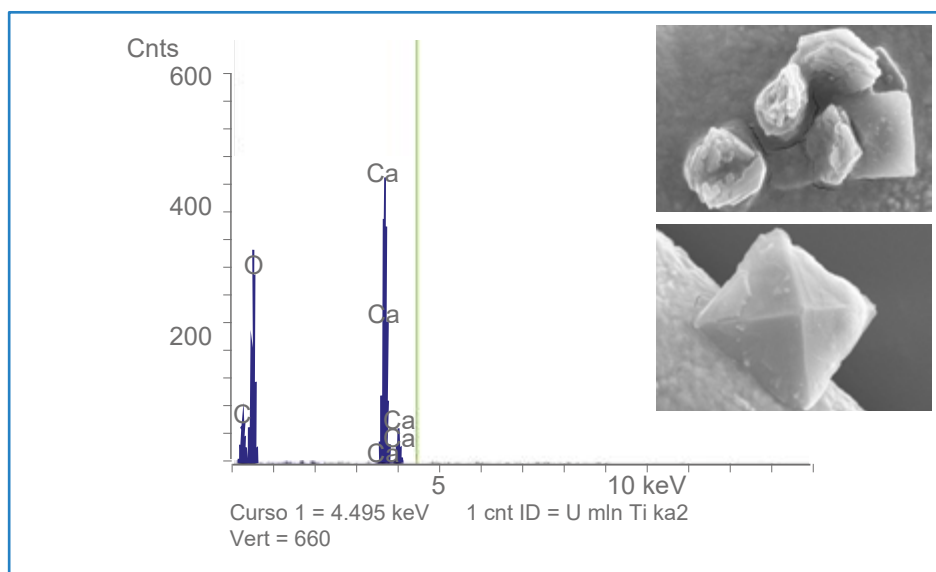


Figura 9. Espectrograma con la emisión del pico de calcio por medio de análisis de energía dispersiva de rayos X y microfotografías de los cristales bipiramidales y amorfos por microscopía electrónica de barrido.

Inoculación con ácido oxálico en tejidos de plantas de arroz

La valoración sobre el efecto ejercido de las diferentes concentraciones de ácido oxálico en tejidos de plantas de arroz, determinó que la incidencia de daño mecánico se manifestó mayormente en las concentraciones del 2% y 2,5%, tanto en espiga como en hoja (cuadro 4). En ambos casos la sintomatología consistió en una decoloración del tejido verde a un tono más claro y rodeado de un borde de color café. En condiciones naturales muchas espiguillas y el follaje, presentan una sintomatología muy similar a la obtenida con las aplicaciones dirigidas del ácido oxálico en esta prueba realizada bajo condiciones controladas (figuras 10 y 11).

De igual manera, la aplicación realizada con pinceles sobre las panículas mostró síntomas similares o coincidentes con los presentados en condiciones naturales (figura 12) y su manifestación en severidad fue en orden creciente de acuerdo a la concentración de ácido oxálico aplicada (cuadro 4). Todas las dosis aplicadas difirieron estadísticamente con el control (agua destilada estéril).

Por ejemplo, estudios realizados con diferentes concentraciones de esta sustancia en hojas de café, han demostrado que la lesión inducida es muy similar a la que provoca en estado natural el hongo causante de la enfermedad Ojo de Gallo (*Mycena citricolor*) en el cultivo de café (Rao y Tewari 1987).

En estudios de laboratorio realizados en Japón, se ha logrado determinar la presencia de cristales de oxalato de calcio y de esta manera la producción de ácido oxálico por colonias de *Burkholderia glumae* en estado salvaje o natural y su diferenciación con la aparición de colonias mutantes. Adicionalmente, las colonias salvajes lograron regular y bajar el pH del medio en que crecían con el fin de poder aprovechar aminoácidos y fuente de carbono. Los mismos autores indican que la producción de ácido oxálico se podría considerar como un factor más de virulencia en la bacteria *Burkholderia glumae* (Kato, et al. 2013, Kato et al. 2014).

Cuadro 4. Incidencia y severidad del daño tisular en diferentes tejidos de plantas de arroz, según concentración de ácido oxálico inoculada. Laboratorio de Fitoprotección / INTA. San José, Costa Rica. 2018.

CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO OXÁLICO	INCIDENCIA DE DAÑO MECÁNICO*				SEVERIDAD*
	ESPIGA		HOJA		PANÍCULA
	1 ddi	4 ddi	1 ddi	4 ddi	4 ddi
Acido oxálico 1.0%	0.00 (a)	0.00 (b)	5.00 (b)	64.00 (a)	62.50 (b)
Acido oxálico 1.5%	0.00 (a)	0.00 (b)	30.50 (b)	78.00 (a)	75.00 (ab)
Acido oxálico 2.0%	25.00 (a)	67.00 (a)	100 (a)	100 (a)	92.50 (a)
Acido oxálico 2.5%	33.00 (a)	74.50 (a)	100 (a)	100 (a)	92.50 (a)
Control	0.00 (a)	0.00 (b)	0.00 (b)	0.00 (b)	0.00 (c)

*= Columnas con igual letra no difieren estadísticamente según prueba DMS 5%



Figura 10. (A, B y C): Daño inducido por la aplicación de ácido oxálico al 2% sobre la espiga de arroz, (D): Control aplicado con agua destilada estéril, (E-F): Síntoma en condiciones naturales inducido por *Burkholderia glumae*. Laboratorio de Fitoprotección / INTA. San José, Costa Rica. 2018.

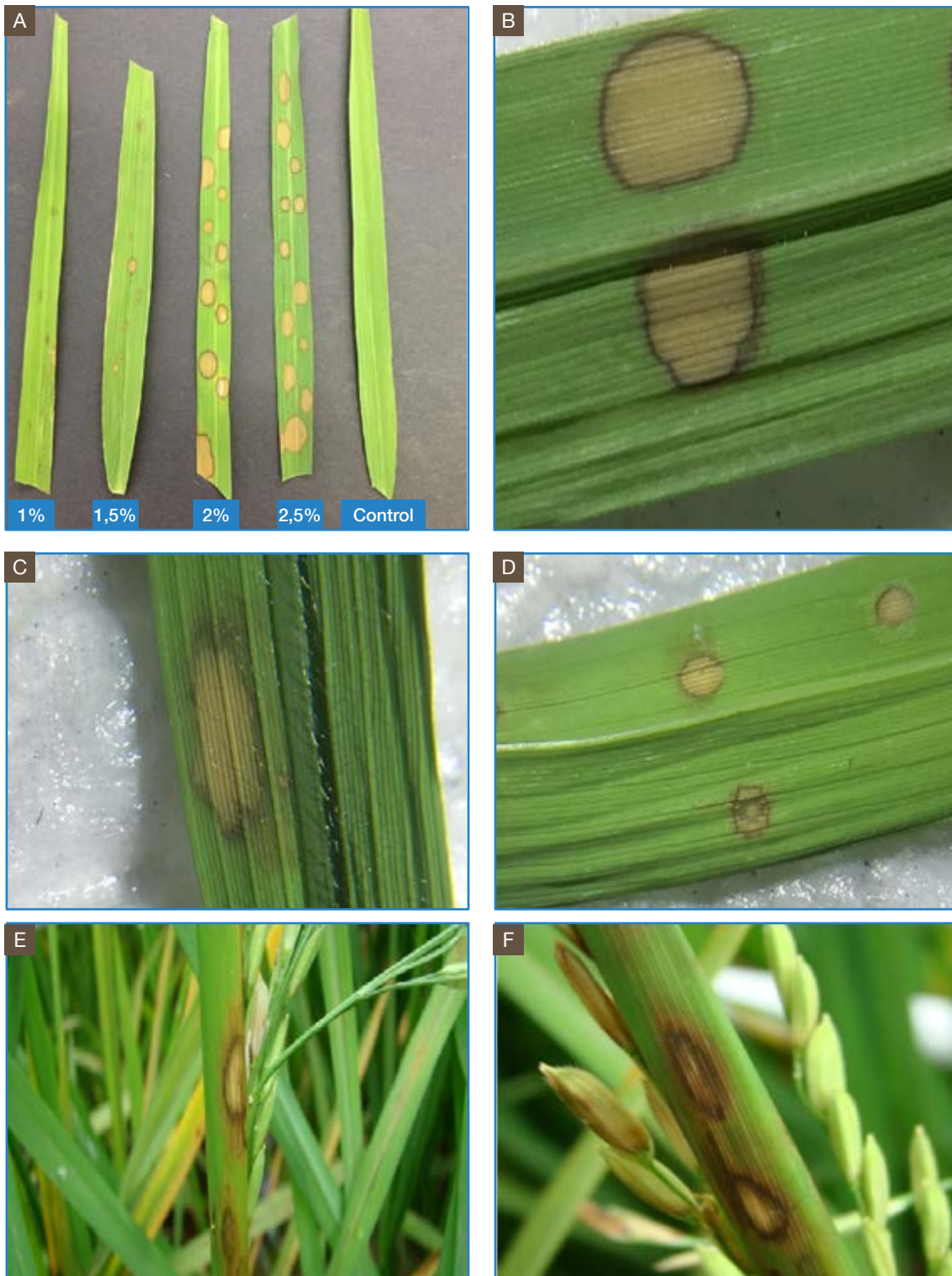


Figura 11. (A): Daño inducido por la aplicación de diferentes concentraciones de ácido oxálico (1%, 1,5%, 2%, 2,5% y Control), (B, C y D): ácido oxálico al 2%, (E-F): Síntoma en condiciones naturales inducido por *Burkholderia glumae*. Laboratorio de Fitoprotección / INTA. San José, Costa Rica. 2018.



Figura 12. Daño inducido por la aplicación con pincel de ácido oxálico al 2% en panícula de arroz. El control es agua destilada estéril. Laboratorio de Fitoprotección / INTA. San José, Costa Rica. 2018.

Inoculación con peróxido de hidrógeno

Dos días después de la inoculación de las diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno hubo manifestación del daño mecánico. Todas las concentraciones mostraron diferencia estadística con el control (agua destilada estéril) con respecto a las variables de incidencia del daño mecánico en hoja y severidad en la panícula (cuadro 5).

La toxina conocida como “toxoflavina” es uno de los factores de virulencia reportados para esta bacteria, la cual fue aislada de tejidos con manifestación de síntomas similares a los provocados por *B. glumae* en condiciones naturales (Iiyama *et al.* 1995). Esta toxina dentro de su proceso infectivo libera peróxido de hidrógeno (Latusan

y Berends 1961), el cual es catalogado como un compuesto altamente tóxico para diversos tipos de células, provocando daño tisular y también con efecto antimicrobiano (Suzuki *et al.* 2004).

Al igual que las inoculaciones con ácido oxálico, el daño mecánico generado por el peróxido de hidrógeno mostró en alguna medida similitud con las lesiones del follaje causados por la bacteria bajo condiciones naturales (figuras 13 y 14). Es importante mencionar que las lesiones en el follaje tienen menor ocurrencia y se pueden presentar cuando la incidencia y severidad de este patógeno alcanzan niveles de daño inmanejables dentro de las plantaciones de arroz.

Cuadro 5. Incidencia en la formación de daño tisular en hoja y severidad en panícula de arroz dos días después de la inoculación con peróxido de hidrógeno a diferentes concentraciones. Laboratorio de Fitoprotección / INTA. San José, Costa Rica. 2018.

CONCENTRACIÓN DE PEROXIDO DE HIDRÓGENO	INCIDENCIA DE DAÑO MECANICO EN HOJA*	SEVERIDAD EN PANÍCULA*
	2 ddi	2 ddi
Peróxido hidrógeno 0,5%	70.00 (a)	45.00 (b)
Peróxido hidrógeno 1,0%	85.00 (a)	87.50 (a)
Peróxido hidrógeno 1,5%	100.00 (a)	85.00 (a)
Peróxido hidrógeno 2,0%	100.00 (a)	90.00 (a)
Peróxido hidrógeno 2,5%	90.00 (a)	90.00 (a)
Peróxido hidrógeno 3,0%	95.00 (a)	90.00 (a)
Control	0.00 (b)	0.00 (c)

*= Columnas con igual letra no difieren estadísticamente según prueba DMS 5%

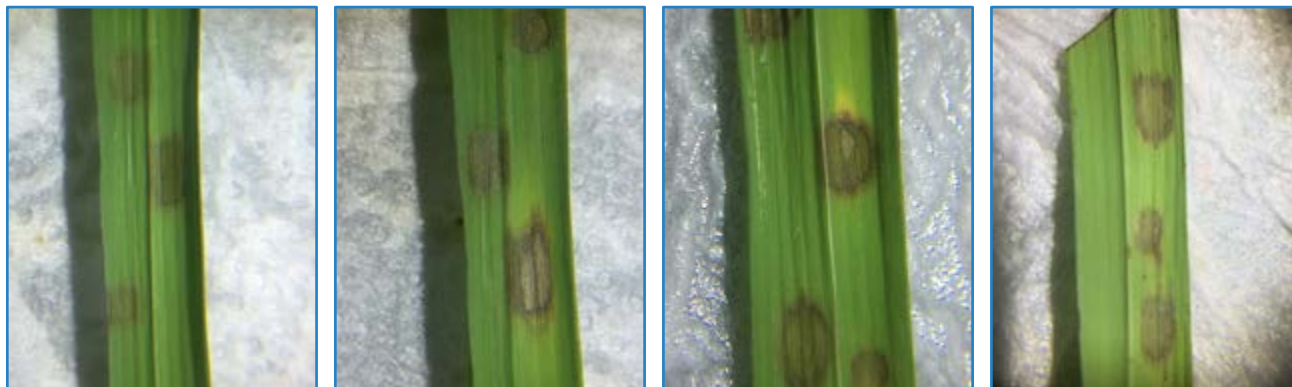


Figura 13. Daño inducido por la aplicación de peróxido de hidrógeno al 2% sobre el follaje de arroz. Laboratorio de Fitoprotección / INTA. San José, Costa Rica. 2018.



Figura 14. Daño inducido por la aplicación de peróxido de hidrógeno al 2% sobre la panícula de arroz. Laboratorio de Fitoprotección / INTA. San José, Costa Rica. 2018.

Inoculación con ácido oxálico + peróxido de hidrógeno + *Burkholderia glumae*

Dado que en los estudios anteriores se logró determinar mayormente daño tisular en follaje y panícula en la concentración del 2% con la aplicación de ácido oxálico y peróxido de hidrógeno; y con síntomas similares a los presentados en condiciones naturales asociados a *B. glumae*; se estableció la siguiente prueba con la inclusión de la inoculación de la mezcla de estas dos sustancias y compararlo con la inoculación de la bacteria.

Los síntomas se empezaron a observar a partir de las 2 horas luego de la inoculación con la mezcla de ácido oxálico y peróxido de hidrógeno

al 2% cada uno, mientras que para empezar a observar síntomas en la inoculación con la bacteria fue necesario esperar 48 horas. Para esta evaluación todos los tratamientos aplicados mostraron diferencias estadísticas frente al control (agua destilada estéril) y el nivel de daño fue bastante similar en el resto de los tratamientos, el cual osciló entre 82,50% y 88,75% (cuadro 6).

Es importante destacar que la sintomatología obtenida con las aplicaciones por separado del ácido oxálico y el peróxido de hidrógeno es similar a la presentada por la inoculación con *Burkholderia glumae*; de igual manera, la inoculación con la

mezcla de estas dos sustancias evidenció una gran similitud de los síntomas causados por esta bacteria en las panículas de arroz (figuras 15 y 16). En condiciones naturales el proceso de infección de la bacteria tiene ocurrencia en horas, pero la manifestación de los síntomas oscila entre 3 a 5 días. En este caso se dieron condiciones de alta temperatura (40°C) a fin de obtener los síntomas evidentes inducidos por la bacteria y estimular a las células bacterianas a su multiplicación y liberación de las toxinas en un periodo de 48 horas. En contraste, los síntomas obtenidos con el accionar del ácido oxálico y del peróxido de hidrógeno, solos o combinados, fue más rápido debido a la pureza química sintética de estas sustancias.

Los resultados obtenidos en estas pruebas demuestran la importancia que tienen estas sustancias como factores de virulencia de la bacteria y probablemente su accionar sea combinado. No obstante, podría darse el hecho de que la presencia de estas sustancias sea co-dependientes de algunos factores que estimulen su ocurrencia. Por ejemplo, Matsuda y Sato (1988) mencionan que la biosíntesis de toxoflavina depende de la temperatura, la cual oscila entre 30°C y 37°C. En el mismo sentido Kato, *et al.*, (2013) en un estudio sobre las características fenotípicas de *B. glumae* indican que la presencia de ácido oxálico se asoció a la existencia de cristales de oxalato de calcio en el sustrato, los cuales se

desarrollaron dentro y fuera de la colonia, tanto a 30°C como a 37°C y concluyen que la bacteria *B. glumae* tiene la capacidad de disminuir el pH del medio o sustrato debido a una alta producción de ácidos y crear condiciones también ácidas en un entorno donde los aminoácidos están presentes como principal fuente de carbono.

Mahenthalingam *et al.*, (2005) indican que altas densidades de la bacteria producen toxoflavina y mediante generación de peróxido de hidrógeno provocan daño tisular y obstrucción de los haces vasculares de las plantas de arroz.

Está documentado que *B. glumae* produce autoinducción, proceso denominado “Quorum Sensing” el cual es un mecanismo de regulación de la “expresión genética” en respuesta a la densidad de población celular. Las células involucradas producen y excretan sustancias, llamadas autoinductoras (acil-homoserina / AHL), que sirven de señal química para inducir la expresión genética colectiva. Es una forma de comunicación celular que genera una modificación genética que controla la liberación de toxinas, la producción de flagelos, enzimas y hormonas (Kim *et al.* 2010, Fuqua y Greenberg 2002, Rush *et al.* 2010). El quorum sensing es esencial para la producción de toxoflavina, oxalato (ácido oxálico) y la motilidad de la bacteria (Kato *et al.* 2014).

Cuadro 6. Severidad en panícula de arroz a las 2 y 48 horas después de la inoculación (hdi), según tratamiento aplicado. Laboratorio de Fitoprotección / INTA. San José, Costa Rica. 2018

TRATAMIENTO	SEVERIDAD	
	2 hdi	48 hdi
Acido oxálico (2%)	70.00 (a)	82.50 (a)
Peróxido hidrógeno (2%)	70.00 (a)	86.25 (a)
Acido oxálico + peróxido de hidrógeno (2%+2%)	72.50 (a)	88.75 (a)
<i>Burkholderia glumae</i> (1.0X10 ⁸ ufc)	0.00 (b)	87.50 (a)
Control	0.00 (b)	0.00 (b)

*= Columnas con igual letra no difieren estadísticamente según prueba DMS 5%



Figura 15. Severidad en panícula con la aplicación de (A): Ácido oxálico 2% vs *Burkholderia glumae*, (B): Peróxido de hidrógeno al 2% vs *Burkholderia glumae* y (C): ácido oxálico 2% + peróxido de hidrógeno 2% vs *Burkholderia glumae*. (D): Control. Laboratorio de Fitoprotección / INTA. San José, Costa Rica. 2018.



Figura 16. Severidad en panícula de arroz 48 horas después de la inoculación, según tratamiento aplicado. Laboratorio de Fitoprotección. San José, Costa Rica. 2018.

AGRADECIMIENTO

Se agradece al Ing. Daniel Vargas Valverde e Ing. Katherine Bonilla Mora por el apoyo brindado

en los procesos de extracción de los cristales de calcio e inoculación de la bacteria en estudio.

LITERATURA CITADA

Appanna, V; Hamel, R. 1999. Metal stress and adaptation in *Pseudomonas fluorescens*: new perspectives. *Recent Res Dev Microbiol* 3: 615–663.

Dutton, M V; EVANS, C S. 1996. Oxalate production by fungi: its role in pathogenicity and ecology in the soil environment. *Canadian Journal Microbiol* 42: 881–895.

Florez, Z N; Urube, D. 2011. Determination of the Infection of *Burkholderia glumae* in Comercial Colombian Rice Varieties. *Rev.Fac.Nal.Agr. Medellín* 64(2): 6093-6104.

Fuqua, C; Greenberg, E. 2002. Listening in on bacteria: acyl homo serine lactona signalling. *Nav. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3:685-695.

Gharieb, M. 2000. Nutritional effects on oxalic acid production and solubilization of gypsum by *Aspergillus niger*. *Mycol Res* 104: 550–556.

Green, F; Clausen, C. 2003. Copper tolerance of brown-rot fungi: time course of oxalic acid production. *Int Biodeter Biodegr* 51: 145–149.

Ham, J H; Melanson, R A; Rush, M C. 2011. *B. glumae*: next major pathogen of rice? *Mol. Plant. Pathol.* 12:329-339.

Hegedus, D; Rimmer, S. 2005. *Sclerotinia sclerotiorum*: when 'to be or not to be' a pathogen? *Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Lett* 251: 177–184.

Iiyama, K; Furuya, N; Takanami, Y; Matsuyama, N. 1995. A role of phytotoxin invirulence of *Pseudomonas glumae*. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan.* 61:470-476.

Jeong, Y; Kim, J; Kim, S; Kang, Y; Nagamatsu, T; Hwang, I. 2003. Toxoflavin produced by *Burkholderia glumae* causing rice grain rot is responsible for inducing bacterial wilt in many field crops. *Plant Dis.* 87:890-895.

Kato, T; Morohoshi, T; Tsushima, S; Ikeda, T. 2014. Characterization of Three Types of Quorum-Sensing Mutants in *Burkholderia glumae* Strains Isolated in Japan. *Journal of Agricultural Science.* 6 (7): 16-26.

Kato, T; Morohoshi, T; Tsushima, S; Ikeda, T. 2013. Phenotypic characterization of colony morphological mutants of *Burkholderia glumae* that emerged during subculture. *Journal of General Plant Pathology* vol 79, 249-259.

Kim, J; Kang, Y; Kim, J; Choi, O; Hwang, I. 2010. Occurrence of *Burkholderia glumae* on Rice and Field Crops in Korea. *Plant Pathol. J.* 26(3): 271-272.

Lambert, P M; Nakata, P A. 2016. Determining the Biochemical Properties of the Oxalate Biosynthetic Component (Obc)1 from *Burkholderia mallei*. En línea. *PLOS ONE* 11(9): 13p. Consultado el día 27 mayo 2020. Disponible en e0163294. doi:10.1371/journal.pone.0163294

Latuasan, H E; Berends, W. 1961. On the origin of toxicity of toxoflavin. *Biochim Biophys Acta* 52:502-508.

Mahenthiralingam, E; Urban N T; Goldberg, J. 2005. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex". *Nat. Rev. Microbiol.* 3:144-156.

Matsuda, I; Sato, Z. 1988. Relation between pathogenicity and pigment productivity in the causal agent of bacterial grain rot of rice. *Ann. Pytopathol. Soc. Jpn.* 54:478.

- Mew, T W. 1992. Compendium of Rice Diseases: Grain Rot. American Phytopathological Society (APS). USA. p. 9
- Munir, E; Yoon, J; Tokimatsu, T; Hattori, T; Shimada, M. 2001. A physiological role for oxalic acid biosynthesis in the wood-rotting basidiomycete *Fomitopsis palustris*. P Natl Acad Sci USA 98: 11126–11130.
- Nakata, P; He, C. 2010. Oxalic acid biosynthesis is encoded by an operon in *Burkholderia glumae*. Department of Pediatrics, USDA/ARS Children's Nutrition Research Center, Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA. Federation of European Microbiological Societies 304 (2010) 177–182
- Oh, J; Goo, E; Hwang, I; Rhee, S. 2014. Structural Basis for Bacterial Quorum Sensing-mediated Oxalogenesis. Department of Agricultural Biotechnology and the Center for Fungal Pathogenesis, Seoul National University, Korea. The Journal of Biological Chemistry. 289 (16): 11465–11475.
- Prado, G. 2010. Añublo Bacterial de la Panícula del Arroz (*B. glumae*). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) / Diapositivas. Colombia. 30 Diap.
- Rao, D V; Tewari, J P. 1987. Production of Oxalic Acid by *Mycena citricolor*, Causal Agent of the American Leaf Spot of Coffee. Phytopathology (EE.UU.) 77(6): 780-785.
- Rao, D V; Tewari, J P. 1988. Suppression of the symptoms of American leaf spot of coffee with calcium hydroxide. Plant Diseases (EE.UU.) 72 (8):688-690.
- Rush, M; Groth D; Ham J; Nandakumar, R. 2010. Bacterial Panicle Blight: causes and suggested control measures. (Diapositivas). Louisiana State University, USA. 52 Diap.
- SAS Institute INC. 2002. Statistical Analysis Systems. Carolina del Norte. Estados Unidos. Versión 9.00.
- Sato, Z; Koiso, Y; Iwasaki, S; Matsuda, I; Shirata, A. 1989. Toxins produced by *P. glumae*. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 55:353-356.
- Sayer, J; Gadd, G M. 1997. Solubilization and transformation of insoluble inorganic metal compounds to insoluble metal oxalates by *Aspergillus niger*. Mycol Res 101: 653–661.
- Shimada, M; Akamatsu, Y; Hattori, T. 1994. A proposed role of oxalic acid in wood decay systems of wood-rotting basidiomycetes. Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Rev 13: 285–296.
- Shingu, Y; Yoneyama, K. 2004. Essential regulator gene *toxR* for toxoflavin biosynthesis of *Burkholderia glumae*. J. Gen Plant Pathol. 70:108-114.
- Suzuki, F; Sawada H; Azegami K; Tsuchiya, K. 2004. Molecular characterization of the *tox* operon involved in toxoflavin biosynthesis of *Burkholderia glumae*. J. Gen. Plant Pathology. 70: 97-107
- Tewari, J P. 1990. Mecanismo de patogénesis del ojo de gallo del cafeto causado por *Mycena citricolor*. Taller Regional sobre roya, ojo de gallo y otras enfermedades del cafeto. Resúmenes. IICA-PROMECAFE, Costa Rica. 48p.

BACULOVIRUS PARA CONTROL DEL PERFORADOR DEL FRUTO (*Tuta absoluta* Meyrick) ASOCIADO AL CULTIVO DE TOMATE (*Solanum lycopersicum*)¹

Katherine Bonilla², Yannery Gómez-Bonilla³

RESUMEN

Baculovirus para control del perforador del fruto (*Tuta absoluta* Meyrick) asociado al cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*). En la presente investigación, se estudió el potencial de control a nivel de bioensayo, de cepas de betabaculovirus aisladas de larvas de *Phthorimaea operculella* Zeller, *Tecia solanivora* Povolny y suelo, sobre larvas de la polilla del tomate (*Tuta absoluta* Meyrick). Las cepas de betabaculovirus: PhopGV-CR1, PhopGV-CR2, PhopGV-CR3, PhopGV-CR4 y PhopGV-CR5 purificadas se revigorizaron en larvas de *P. operculella* Z y *Tecia solanivora* P. En los ensayos de patogenicidad se impregnaron hojas de tomate desprendidas (*Solanum lycopersicum*) con tres concentraciones teóricas: 1×10^3 , 1×10^5 , 1×10^7 cuerpos de inclusión/ml (CI/ml) de cada cepa de baculovirus y se transfirieron larvas L1 de *T. absoluta* M. La cepa PhopGV-CR2 no presentó mortalidades superiores al tratamiento control. Las cepas PhopGV-CR1, PhopGV-CR3, y PhopGV-CR5 mostraron un aumento en la mortalidad de las larvas conforme aumento la concentración del virus. PhopGV-CR4 presentó una mortalidad mayor al testigo, sin embargo, no se mostró un aumento con el incremento de la concentración. Los síntomas observados en las larvas infectadas por baculovirus fueron coloración blanquecina, flacidez, poco movimiento y muerte. Se seleccionaron las cepas PhopGV-CR3 y PhopGV-CR5 para determinar la concentración letal media. La CL50 de PhopGV-CR3 corresponde a 1×10^4 CI/ml y para la cepa PhopGV-CR5 es 1×10^2 CI/ml. Por último, fotografías tomadas por microscopio electrónico de transmisión mostraron la distribución de los CI de PhopGV-CR3 en distintas secciones a lo largo del cuerpo de las larvas. La información generada en esta investigación permitió identificar las cepas PhopGV-CR3 y PhopGV-CR5 como cepas promisorias para el control de la especie de *T. absoluta* M.

Palabras clave: Control biológico, baculovirus, polilla del tomate.

ABSTRACT

Baculovirus to control the tomato (*Solanum lycopersicum*) pinworm (*Tuta absoluta* Meyrick). In this study different strains of betabaculovirus, PhopGV-CR, isolated from potato tuber moths (*Phthorimaea operculella* Zeller, *Tecia solanivora* Povolny and soils were investigated regarding its potential for biological control of tomato pinworm (*Tuta absoluta* M.). The betabaculovirus strains: PhopGV-CR1, PhopGV-CR2, PhopGV-CR3, PhopGV-CR4, PhopGV-CR5 were amplified on *P. operculella* Z. and *T. solanivora* P. larvae. Neonate larvae of *T. absoluta* were placed on inoculated tomato leaves with three theoretical concentrations: 1×10^3 , 1×10^5 , 1×10^7 occlusion bodies/ml (OBs/ml) of each baculovirus strain. The mortality response of

1 Actividad que formo parte del proyecto financiado por FITTACORI y EL INTA.

2 Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria, INTA – Costa Rica. kbonilla@inta.go.cr. Sede del Laboratorio de Servicios de Fitoprotección del INTA. Sabana Sur San José. ORCID: 0000-0003-0899-4751.

3 Yannery Gómez-Bonilla, INTA. yangomez27@yahoo.com. ORCID: 0000-0002-4229-7434

PhopGV-CR1, PhopGV-CR3, and PhopGV-CR5 were proportional to pathogen concentration. PhopGV-CR4 presented a higher mortality than the control, however, it showed no increase when augmenting concentration. PhopGV-CR2 did not showed significant virulence against larvae of *T. absoluta* M. The symptoms showed by virus infection in *T. absoluta* M. were milky appearance, flaccid body, loss of movement and dead. CL50 of PhopGV-CR3 was 1×10^4 CI/ml and 1×10^2 CI/ml for PhopGV-CR5. At last, micrographs captured by a transmission electronic microscope the distribution of the OBs through the body of a larvae infected by PhopGV-CR3. These results showed PhopGV-CR3 and PhopGV-CR5 as promissory strains to control *T. absoluta* populations.

Keywords: Biological control, baculoviruses, tomato pinworm.

INTRODUCCIÓN

La producción del cultivo del tomate es una actividad económica importante a nivel nacional. En Costa Rica se producen aproximadamente 69.040,45 toneladas métricas sembradas en 1.171,9 hectáreas y emplea 1.012 personas divididas entre pequeños y medianos productores (López 2017; FAOSTAT 2017).

El cultivo de tomate puede ser afectado en gran medida por las larvas de lepidópteros de la familia Gelechiidae, específicamente *Tuta absoluta* Meyrick. Esta plaga fue reportada en el país en el año 2014 por el Servicio Fitosanitario del Estado (IPPC 2015). El daño que ocasiona a la planta y al fruto disminuye el rendimiento y calidad potencial, lo que genera pérdidas económicas (Roditakis *et al.* 2012). Las prácticas realizadas para el control de esta plaga se reducen a la aplicación constante de insecticidas y manejo etológico (Cocco *et al.* 2013). Estas aplicaciones además de constituir un aumento en los costos de producción afectan negativamente las poblaciones de los enemigos naturales, la generación de resistencia por parte de la plaga, daños ambientales y el deterioro de la salud humana bajo manejo inadecuado (Picanço *et al.* 1995).

El estudio de controladores biológicos ha adquirido importancia durante los últimos años con el fin de detener y disminuir la creciente demanda de uso de insecticidas en estos sistemas de producción. Por lo que la utilización de virus entomopatógenos (baculovirus) se muestra como un biopesticida potencial para el manejo integrado de la plaga (Lobo *et al.* 2007).

Los baculovirus (Familia: Baculoviridae) infectan artrópodos (insectos y crustáceos), principalmente de las familias del orden Lepidoptera, Hymenoptera, y Diptera (Van Beek y Davis 2007; Theilmann *et al.* 2005; Fuxa 2004; Inceoglu *et al.* 2001; Evans 1986). Dentro de esta familia se reconocen cuatro géneros: *Alphabaculovirus*, *Betabaculovirus*, *Gammabaculovirus* y *Deltabaculovirus*. Los primeros dos géneros infectan insectos de la familia Lepidoptera, el tercer género Hymenoptera y el último Diptera, respectivamente (Carstens y Ball 2009; Jehle *et al.* 2006).

Estos virus son altamente seguros y potencialmente efectivos, ya que presentan un rango limitado de huéspedes, su replicación es limitada a invertebrados y no hay evidencia de que se presente resistencia por parte de la plaga. Además, no presentan patogenicidad cruzada sobre plantas, mamíferos, aves, peces, o insectos no blanco (Ojeda *et al.* 2002).

Adicionalmente, los baculovirus tienen características únicas que pueden ser aprovechadas, incluyendo la capacidad de replicarse en sus huéspedes, dispersarse en el cultivo y potencial de ser producidos a escala local o regional. (Williams 2002).

La adaptación de cepas de baculovirus a nuevos hospederos ha sido informada por varios autores. Estudios han demostrado que esta adaptación se da tanto en cepas *Alphabaculovirus* como en *Betabaculovirus*. Ignoffo (1968) menciona que las cepas de baculovirus no solo pueden

causar mortalidad a su especie de insecto sino también a especies de insectos pertenecientes a la misma familia.

A nivel nacional y centroamericano no existe investigación sobre los virus entomopatógenos

de plagas en el cultivo de tomate. Por lo que la presente investigación pretende estudiar la eficacia biológica a nivel de bioensayo de cepas de baculovirus, aisladas de larvas de *Phthorimaea operculella* Zeller. o *Tecia solanivora*, Povolny, sobre larvas de *Tuta absoluta* M.

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen de las cepas

Las cepas de baculovirus provenían del banco de microorganismos del Laboratorio de Fitoprotección del Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA), ubicado en Mata Redonda, San José. En este lugar se desarrollaron los ensayos *in vitro*. Las cepas fueron aisladas, caracterizadas y codificadas anteriormente por Gómez- Bonilla *et al.* (2011a y b).

Las cepas utilizadas fueron las siguientes: PhopGV-CR1, PhopGV-CR2, PhopGV-CR3, PhopGV-CR4, PhopGV-CR5. La revigorización de las cepas para potenciar su virulencia se desarrolló en larvas de *Tecia solanivora* P. y en *Phthorimaea operculella* Z.

El procedimiento para la cría de las polillas y revigorización se basó en la metodología descrita por Gómez-Bonilla *et al.* (2011a), con algunas modificaciones.

Cría de *T. solanivora* y *P. operculella*

Los estadios larvales de *T. solanivora* P. y *P. operculella* Z. se recolectaron de un campo de papa ubicado en la Estación Experimental Carlos Durán (N 09°55'08", O 83°52'43") en Oreamuno de Cartago. Las colonias se mantuvieron en un cuarto de cría en condiciones ambientales naturales (60% H.R, 26 °C, L16:08 h de fotoperíodo) en el Laboratorio de Fitoprotección del INTA.

Los tubérculos de papa infestados de larvas de las polillas fueron colocados en tres cajas de madera con dimensiones de 40x40x40 cm. Cuando los especímenes llegaron al estado adulto se introdujeron nuevas papas previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio (5%). Los tubérculos nuevos sirvieron como sitios de oviposición de los huevos de las polillas y como medio de alimentación para las larvas, para continuar con el mantenimiento de las crías. Dentro de las cajas se colocaron motas de algodón impregnadas de una solución azucarada al 30% (vol/vol) preparada con miel para la alimentación de adultos.

Recolección de larvas neonatas de *P. operculella* o *T. solanivora* para la revigorización de las cepas

Para la colecta de huevos se tomaron aproximadamente 30 adultos (15♂:15♀) de una de las cajas de crías y se transfirieron a recipientes plásticos de un volumen de cuatro litros, previamente forrados con papel craft internamente a fin de que las hembras colocaran en este las posturas. Dentro del recipiente se colocó una mota de algodón impregnado de solución azucarada con miel al 30% (vol/vol) para su alimentación y se tapó el recipiente con una tela de malla por un período de 48 horas. Luego se extrajo el papel craft con las posturas y se cortaron las áreas del papel donde se encontraron huevos. Posteriormente estos papeles con huevos se colocaron en platos Petri de vidrio sellados con parafilm y se pusieron a incubar a 27°C, en oscuridad total. En estas condiciones los huevos tardaban aproximadamente 96-120 h en eclosionar.

Revigorización de las cepas

Por cada una de las cepas se utilizaron seis tubérculos sanos (peso aproximado de 50 gramos). Cada tubérculo se desinfectó por un 1 min con hipoclorito de sodio (0,5%) y posteriormente se lavó con agua destilada y se secó a temperatura ambiente. Cada tubérculo de papa se asperjó con 2 ml de cepa pura previamente preparada (1×10^7 CI/ml) con un aerógrafo con una descarga de 3 ml/min. Luego de este proceso, con ayuda de un pincel, se colocaron 15 larvas en estado L1 por tubérculo. Los tubérculos se ubicaron en cajas plásticas de 412 ml con tapa y se incubaron por 25 días en la cámara ambiental (27°C, 60% H.R y 16L:8O h de fotoperiodo).

A partir de los 15 días se procedió a recolectar las larvas parasitadas por baculovirus que se encontraban fuera de los tubérculos. A los 24 días se peló y cortó cada una de las papas cuidadosamente para extraer las larvas enfermas que se encontraban muertas dentro de las galerías. Todas las larvas fueron colocadas en microtubos de 2 ml a -20 °C hasta el momento de ser utilizadas en los bioensayos con *Tuta absoluta* M.

Cría de *Tuta absoluta* M.

Las larvas y pupas de *T. absoluta* M se colectaron de una plantación de tomate (N 9°53'18", O 84°10'44") ubicada en Santa Ana, San José y se colocaron en cajas de madera y vidrio con dimensiones de 40x40x40 cm. Las larvas se alimentaron de plantas de tomate de la variedad JR de una edad de 40 días sembradas en potes. Una vez emergidos los adultos se colocaron motas de algodón impregnadas de una solución azucarada al 10 % (vol/vol) preparada con miel y agua destilada para su alimentación.

Recolección de larvas neonatas de *T. absoluta* M.

Para dicho proceso se sustituían las plantas de tomate de las cajas de cría y se colocaban cuatro folíolos de tomate sanos y previamente desinfectados en erlenmeyers con el peciolo

sumergido en agua estéril; para que no perdieran la turgencia; las cuales servían de sustrato para que los adultos hembras colocaran las posturas. Transcurridas 48 horas, se extraían los folíolos con las posturas. Con un pincel fino y suave se transferían los huevos a discos de algodón donde se colocaban 100 huevos por disco. Una vez colectadas estas posturas se colocaron los discos de algodón en cajas plásticas transparentes de 412 mL y se introducían en la cámara ambiental (25°C, 70% H.R y 12L:12O h de fotoperiodo).

Evaluación de las cepas de baculovirus sobre larvas de *T. absoluta* M.

La evaluación de la eficacia de cada cepa se llevó a cabo de forma individual, en períodos diferentes. La evaluación de las cepas de baculovirus en *T. absoluta* M. se realizó basado en la metodología utilizada por Moura *et al.* 2010 con modificaciones.

Preparación de las cepas

La preparación previa de las cepas de baculovirus se realizó colocando una larva parasitada (1 Eq larval= 10^9 cuerpo oclusivos/ml (Zeddám *et al.* 2003)) en un microtubo de centrifuga y se añadió 500 µl de Tris 0,01 M y SDS 0,1% (pH 7.5), luego se maceró con un pistilo, una vez triturada la larva se añadió 500 µl de H₂O bidesilada. Posteriormente se colocó la muestra en un agitador, para garantizar la homogeneidad de la mezcla. Las concentraciones utilizadas en los tratamientos se prepararon mediante la técnica de diluciones seriadas.

Bioensayos de patogenicidad

En cada bioensayo se utilizaron hojas de tomate desprendidas, compuestas de tres a cinco folíolos, se desinfectaron con hipoclorito de sodio (0,05%) por 1 min y posteriormente se lavaron con agua destilada estéril y se secaron al ambiente.

Las plantas control se impregnaron con agua destilada estéril constituido por 20% de Tris 0,01 M y SDS 0,1% (pH 7.5). Cada concentración constituyó un tratamiento y cada tratamiento consistió en 6 repeticiones. Cada repetición estaba conformada por grupos de 10 larvas L1. Se utilizaron tres concentraciones teóricas (1×10^3 CI/ml, 1×10^5 CI/ml y 1×10^7 CI/ml) por cada cepa de baculovirus. La cantidad de aplicación consistió en 1 mL por el haz y 1 mL por el envés de la hoja y fue realizada con un aerógrafo. Después de secadas las hojas al aire, se colocaron en platos petri con algodón húmedo adherido al peciolo de la hoja para evitar la desecación. Al algodón se le añadió agua cada vez que fue necesario. Seguido se transfirieron grupos de 10 larvas (L1) a cada una de las hojas de tomate. Todo el procedimiento se realizó en una cámara de transferencia.

Después de 12 días de incubación en ambiente controlado (Temperatura $25 \pm 3^\circ\text{C}$, humedad relativa 50%, 12L:12O h de fotoperiodo) se contabilizó la cantidad de pupas y larvas sanas (sobrevivientes) y el total de larvas infectadas. Las larvas o pupas muertas y enfermas se clasificaron como “larvas muertas por virus”, las larvas y pupas vivas sanas se clasificaron “sobrevivientes”.

Determinación de la concentración letal media (CL50) de dos cepas patógenas a *T. absoluta* M.

Con los resultados obtenidos en los bioensayos anteriores, se seleccionaron las cepas PhopGV-CR5 y PhopGV-CR3 para la determinación de la CL50. La metodología utilizada fue la misma que los ensayos de patogenicidad. Las concentraciones utilizadas fueron: 1×10^3 CI/ml, 1×10^4 CI/ml, 1×10^5 CI/ml, 1×10^6 CI/ml y 1×10^8 CI/ml.

Fotografías al microscopio electrónico

Por último, se envió una larva infectada con la cepa de baculovirus PhopGV-CR3 al Centro de Investigación de Estructura Microscópicas (CIEMIC) de la Universidad de Costa Rica para obtener fotografías de los tejidos infectados por la cepa por medio del microscopio de barrido.

Análisis de los datos

Los datos obtenidos en la evaluación de cada una de las cepas se sometieron a un modelo generalizado lineal mixto con distribución binomial. La concentración letal media (CL50) se determinó con la prueba Probit con el software JMP.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La interacción de cada especie de baculovirus – hospedero es única, ya que esta define su susceptibilidad y como se pueden ver influenciadas por agentes externos como son las condiciones ambientales (Gómez-Valderrama y Villamizar 2013). Los resultados de las pruebas de patogenicidad para determinar si las cepas de baculovirus provenientes de *P. operculella* Z., *T. solanivora* P. y suelo se adaptaban a un nuevo hospedero, como es el caso de *T. absoluta* M., se muestran a continuación:

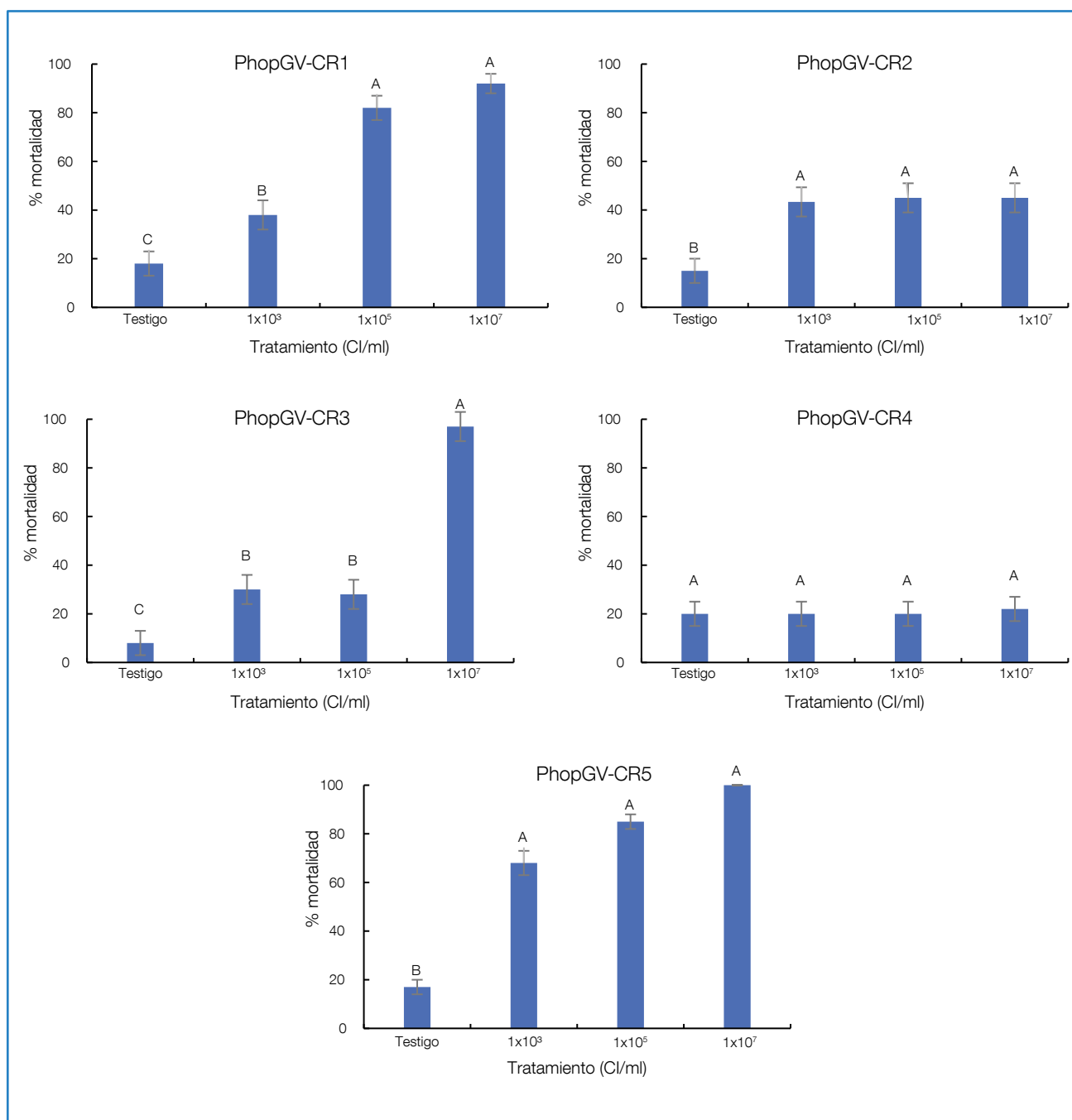


Figura 1. Porcentaje de la mortalidad promedio (\pm error estándar) de larvas de *T. absoluta* M. infectadas con cepas de betabaculovirus trece días después de la inoculación. San José, Costa Rica. 2016.

Medias con misma letra en la columna no son estadísticamente diferentes (LSD Fisher 0,05)

*CI/ml: cuerpos inclusión por mililitro.

La cepa PhopGV-CR1 presentó la mayor mortalidad de las larvas de *T. absoluta* M. en las concentraciones 1×10^5 y 1×10^7 . Las medias de ambas concentraciones no presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí, pero sí con el tratamiento de la menor concentración. La concentración 1×10^3 controló una menor proporción de larvas en comparación a las otras dos concentraciones.

Las distintas concentraciones de la cepa PhopGV-CR2 mostraron una mortalidad estadísticamente significativa mayor que el testigo, lo cual indica patogenicidad de la cepa sobre las larvas de *T. absoluta* M., sin embargo, entre las tres concentraciones evaluadas no se observó diferencias estadísticamente significativas.

La cepa PhopGV-CR3 causó mayor mortalidad de las larvas en la concentración de 1×10^7 . Las concentraciones 1×10^3 y 1×10^5 no presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí, pero sí mayor que el tratamiento control. La cepa PhopGV-CR4 no presenta alta virulencia en ninguna de las concentraciones, ni un mejor control que el testigo.

La cepa PhopGV-CR5 presentó una alta patogenicidad en larvas de *T. absoluta* M. en bajas concentraciones.

En los bioensayos en general se presentaron porcentajes de mortalidad en los grupos testigo, esto puede ser debido a causas naturales o manipulación de las larvas (Rosenheim y Hoy 1989). El menor porcentaje de mortalidad en grupo control se presenta en el bioensayo de la cepa PhopGV-CR3 con un $8,00 \pm 4,00$ % de mortalidad y el mayor en el bioensayo de la cepa PhopGV-CR4 con $20 \pm 5,00$ % de mortalidad. Moura et ál. (2010) documenta una mortalidad natural de *T. absoluta* M. de $27,8 \pm 10,1$ % a nivel de bioensayo.

En general las cepas presentaron un grado de patogenicidad sobre las larvas de *T. absoluta* M., a excepción de la cepa PhopGV-CR4. Esta adaptación de las cepas de baculovirus a un nuevo hospedero, como el caso de las larvas de *T. absoluta* M., es posible que se presente por

la heterogeneidad genética que permite que las poblaciones virales sean más adaptables a condiciones ambientales variables, los cuales incluyen diferentes hospederos y distintos haplotipos del mismo hospedero (Hodgson et al. 2004).

Esta variabilidad genotípica se presenta en aislamientos colectados en un mismo sitio, aislamientos colectados de la misma especie en diferentes lugares geográficos o incluso colectados en un único individuo (Hitchman et al. 2007; Murillo et al. 2006; Cory y Myers 2003; Lery et al. 1998). Para el caso de las cepas experimentales, Gómez-Bonilla et al. (2011b) menciona que las cepas experimentales (PhopGV-CR1, PhopGV-CR2, PhopGV-CR3, PhopGV-CR4, y PhopGV-CR5) presentan una mezcla de distintos genotipos, lo cual les permite maximizar la probabilidad de infección sobre un nuevo hospedero (Espinel-Correal et al. 2010; Hodgson et al. 2004).

La heterogeneidad genotípica se puede presentar por diversos factores como la recombinación entre diferentes genotipos, mutaciones puntuales, duplicación de secuencias. Sin embargo, es importante recalcar que las variaciones no se dan en todo el genoma sino en regiones hipervariables y que estos cambios pueden generar cambios significativos en la actividad biológica del baculovirus (Cory et al. 2005).

Los cambios significativos en la actividad biológica pueden darse en el grado de patogenicidad, la virulencia y la productividad, que favorecen la adaptación al hospedero o a las condiciones ambientales (Harrison 2009; Hitchman et al. 2007; Cory y Myers 2003), tal y como se observa en los resultados obtenidos en los bioensayos donde se registraron mortalidades por infección de baculovirus en un nuevo hospedero, como lo es *T. absoluta* M.

Gómez et al. (2011b) mencionan en su investigación que la cepa PhopGV-CR3 resultó altamente virulenta a *T. solanivora* P. y *P. operculella* Z. Lo cual es un indicador de que puede adaptarse a los distintos hospederos que coexisten en un mismo sitio; tomando en consideración que *T. absoluta* M. también es responsable de la formación de galerías en el follaje del cultivo de papa al igual que *P. operculella* Z.

La cepa PhopGV-CR5, mostró una alta patogenicidad en la menor concentración (1×10^3 CI/ml). Un comportamiento similar fue observado por Gómez-Bonilla *et al.* (2011b) en las cepas PhopGV-CR3 y PhopGV-CR2 con las concentraciones a 0,5 CI/mm² y 5 CI/mm², respectivamente, en la cuales se registró una mortalidad de más de un 50% cuando fueron inoculadas sobre especímenes de *T. solanivora* P. Aunque la metodología no es similar a la realizada en esta investigación, se puede observar que existe una tendencia en la que las concentraciones menores utilizadas muestran una alta patogenicidad sobre este hospedero.

Moura *et al.* (2010) realizaron pruebas de susceptibilidad de una cepa brasileña de granulovirus aislada de la especie *P. operculella* Z. sobre larvas de *T. absoluta* M. Las concentraciones utilizadas fueron $1,1 \times 10^3$ CI/ml, $1,1 \times 10^4$ CI/ml, $1,1 \times 10^5$ CI/ml, $1,1 \times 10^6$ CI/ml, $1,1 \times 10^7$ CI/ml y $5,5 \times 10^7$ CI/ml. Las concentraciones entre $1,1 \times 10^4$ CI/ml y $1,1 \times 10^6$ CI/ml presentaron mortalidades entre 41 y 60% y no presentaron diferencias estadísticas entre sí.

Alcazar y Angéles (1996) documentan en su investigación en la que evaluaron la patogenicidad de una cepa peruana de granulovirus aislada de *P. operculella* Z. sobre larvas de *T. absoluta* M. que esta cepa también se adaptó a este nuevo hospedero.

Estas dos últimas investigaciones evidencian la adaptación de cepas de granulovirus aisladas de *P. operculella* Z. a un nuevo hospedero (*T. absoluta* M.), similar a los resultados obtenidos en esta investigación para las cepas PhopGV-CR3, PhopGV-CR5 y PhopGV-CR1.

También Espinel-Correal *et al.* (2010) determinaron que aislamientos nativos de granulovirus de *T. solanivora* P. se adaptan a una nueva especie: *P. operculella* Z. lo que corrobora que las cepas se pueden adaptar a nuevos hospederos.

Un aspecto importante a considerar es que las cepas PhopGV-CR3, PhopGV-CR5 fueron aisladas de suelo y se adaptaron *T. solanivora* P. y *P. operculella* Z. según lo obtenido por Gómez *et al.* (2011b) y a un nuevo hospedero obtenido en esta investigación como lo es *T. absoluta* M.

Richards y Christian (1999) y Murillo *et al.* (2006) mencionan el haber aislado cepas de SNPV y MNPV de suelo las cuales resultaron patogénicas para *Helicoverpa armigera* y *Spodoptera exigua* incorporando muestras de suelo en las dietas artificiales utilizadas para criar insectos.

A pesar de la variabilidad genotípica de las cepas de baculovirus para la adaptación a nuevos huéspedes hay factores que afectan la adaptación de los baculovirus a un nuevo hospedero, entre estos se encuentran los mecanismos de inmunidad del hospedero, las interacciones entre diferentes genotipos presentes en el hospedero y las interacciones entre los aspectos ecológicos del patógeno y el ambiente (Gómez *et al.* 2009).

La cepa PhopGV-CR4 no presentó patogenicidad, esto puede ser debido a diversos factores: las barreras físicas, fisiológicas o la inmunidad del hospedero. La primera barrera que debe atravesar el baculovirus para poder infectar eficientemente el hospedero es el intestino medio. En este sitio hay varios sistemas de defensa para proteger las células de una posible infección como lo es la presencia de la membrana peritrófica, la muda de las células del intestino medio y la excreción de enzimas (proteasas y lipasas) con actividad viricida (Sparks *et al.* 2008; Cory y Myers 2003; Wang y Granados 2000).

Otro mecanismo que impide la infección por los baculovirus en el hospedero es el reconocimiento, donde los hemocitos identifican y encapsulan las células virales. La apoptosis también es una estrategia de defensa activada por las enzimas caspasas en el hospedero. Por último, la inmunidad causada por la enzima fenoxilasa que se encuentra en el plasma de los insectos, la cual presenta efectos viricidas (McNeil *et al.* 2010; Sparks *et al.* 2008; Trudeau *et al.* 2001).

Los síntomas que se observaron en las larvas de *T. absoluta* M. son los mismos documentados por Moura *et al.* (2010), Alcázar y Ángeles (1996) y Gómez-Valderrama *et al.* (2014). La sintomatología presentada fue un cambio de color de verde claro (larva sana) a una coloración lechosa del cuerpo fragilidad de los tejidos, flacidez y muerte o poco movimiento de las larvas (figura 2).

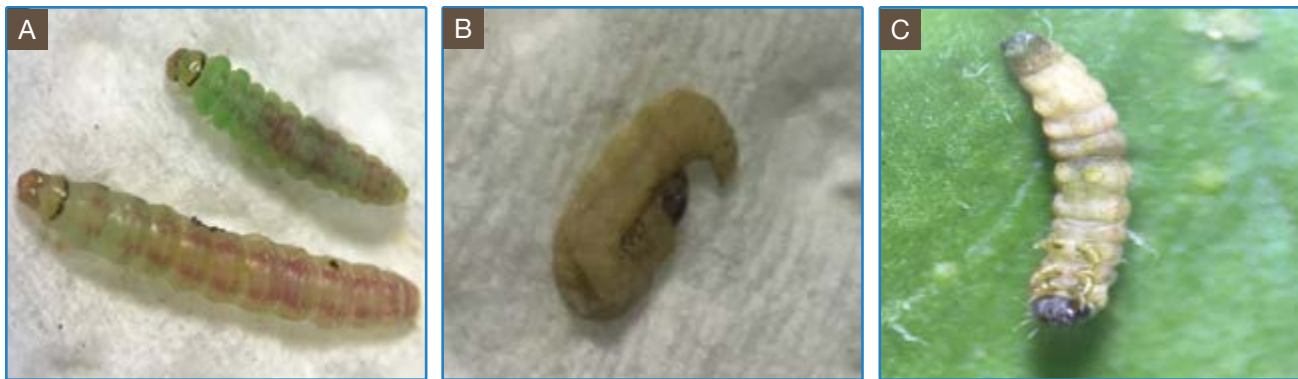


Figura 2. Larvas de *T. absoluta* M. sanas (A) y enfermas por baculovirus (B y C) de 12 días de edad colectadas en el bioensayo de la cepa PhopGV-CR3. San José, Costa Rica. 2016.

Determinación de la CL50

En la Figura 3 se indican los tratamientos evaluados, así como el porcentaje de mortalidad de larvas que se obtuvo con la aplicación de la cepa PhopGV-CR3 y PhopGV-CR5. Se evidenció que hay una relación entre el aumento de la concentración y la mortalidad presentada por las larvas. La concentración letal media para la cepa PhopGV-CR3 es de $1 \times 10^{4.1}$ CI/ml y para PhopGV-CR5 de $1 \times 10^{2.5}$ CI/ml.

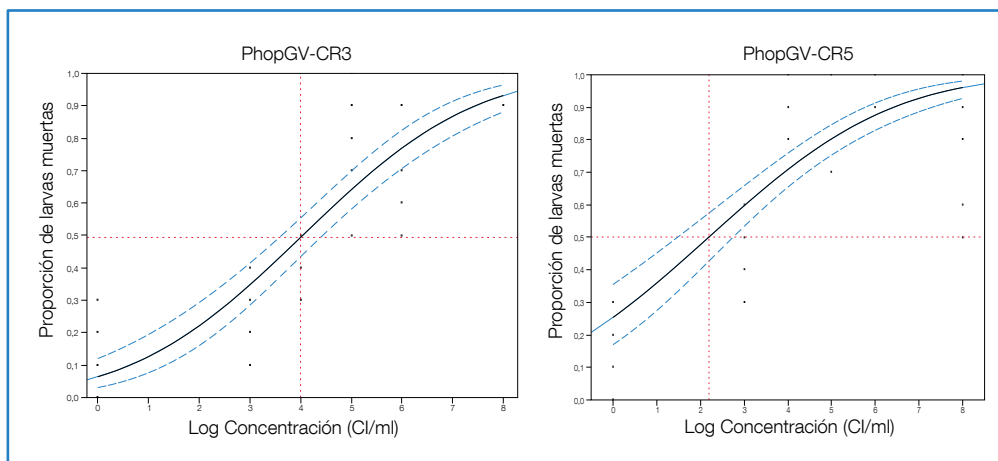


Figura 3. Relación de la concentración del virus contra la respuesta de mortalidad entre PhopGV-CR3 y PhopGV-CR5 y larvas de *T. absoluta* M. en hojas de tomate. Puntos: Datos observados, línea sólida: curva ajustada concentración-mortalidad por el modelo probit y línea punteada: límites de confianza al 95%. San José, Costa Rica. 2016.

Moura *et al.* (2010) documentan una tendencia similar a los datos obtenidos con la cepa PhopGV-CR3, donde la mortalidad de *T. absoluta* M. aumenta con la concentración de cepa de granulovirus (aislamiento nativo en larvas de *P. operculella* Z. en Brasil). Estos autores determinan que la concentración letal media es de $1,05 \times 10^4$ CI/ml. Por otro lado, Angéles y Alcázar

(1995) registraron que la concentración letal media para *Tuta absoluta* M. es $3,5 \times 10^6$ CL/ml de una cepa peruana de granulovirus aislada de *P. operculella* Z.

Gómez-Bonilla *et al.* (2011b) realizó el cálculo de la dosis letal media de las cepas PhopGV-CR1, PhopGV-CR2, PhopGV-CR3, PhopGV-CR4,

PhopGV-CR5 y PhopGV-1346 (cepa tunecina de granulovirus) en larvas de *P. operculella* Z. y *T. solanivora* P. Las concentraciones que utilizó fueron: 0.5, 5, 50, 500 y 5000 CI/mm². La CL50 en *T. solanivora* P. de PhopGV-CR3 fue de 0.5 y CI/mm² y para la cepa PhopGV-CR2 de 5 CI/mm². Aunque la metodología es distinta a la usada en esta investigación se puede observar que estas cepas tienen la capacidad de infectar dos especies de polilla pertenecientes a la misma familia.

En la Figura 4 se observan los cuerpos de inclusión de una larva de *T. absoluta* infectada con la cepa PhopGV-CR3 tomadas al microscopio electrónico. Los cuerpos inclusión presentan forma ovoide y con un virion por cuerpo de inclusión los cuales son las características típicas de los granulovirus, específicamente del género *Betabaculovirus* (Friesen 2007; Funk *et al.* 1997).

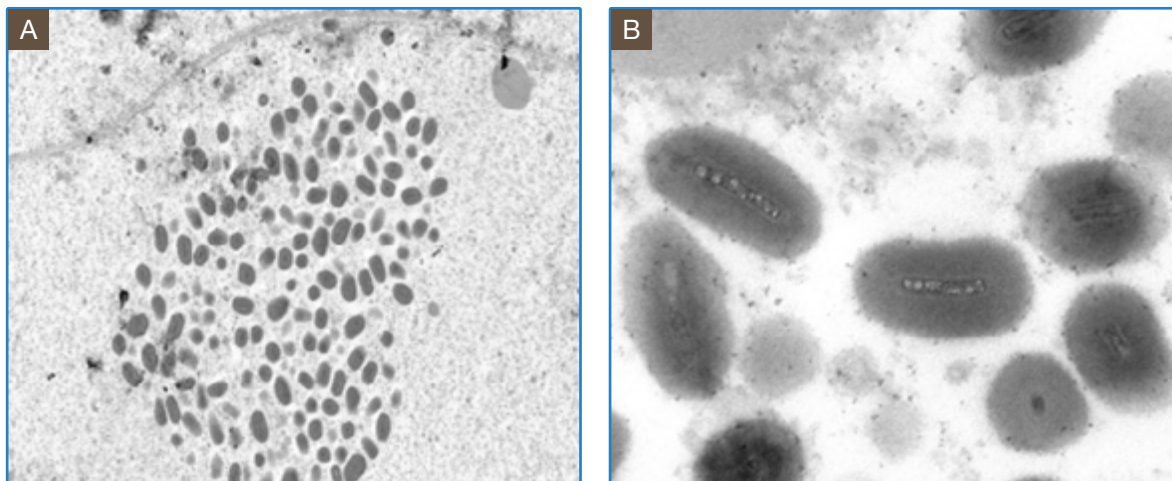


Figura 4. Fotografías al microscopio electrónico de cuerpos de inclusión de la cepa PhopGV-CR3 en corte transversal (barra: 1 μ m) del cuerpo de una larva de *T. absoluta* (A). Cuerpos de inclusión con una nucleocapside embebida (barra: 200 nm) (B). CIBCM, San José, Costa Rica. 2016.

LITERATURA CITADA

Ángeles, I; Alcázar, J. 1996. Susceptibilidad de la polilla *Scrobipalpaloides absoluta* al virus de la granulosis de *Phthorimaea operculella* al virus PóVG. Rev. Per. Ent. 38:65-70.

Carstens, EB; Ball, LA. 2009. Ratification vote on taxonomic proposals to the international Committee on Taxonomy of Viruses. Arch Virol 101:1181-1188.

Cocco, A; Deliperi, S; Delrio, G. 2013. Control of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) in greenhouse tomato crops using the mating disruption technique. Journal of Applied Entomology 137(1-2):16-28.

Cory, J; Myers, J. 2003. The ecology and evolution of insect viruses. Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics 34:239-272.

Cory, J; Green, B; Paul, R; Hunter-Fujita, F. 2005. Genotypic and phenotypic diversity of a baculovirus population within an individual insect host. Journal of the invertebrate pathology 89(2):101-111.

Espinel-Correal, C; Lery, X; Villamizar, L; Gómez, J; Zeddarn, JL; Cotes, A; López-Ferber, M. 2010. Genetic and biological analysis of colombian *Phthorimaea operculella* granulovirus isolated from *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae). Applied and Environmental Microbiology 76(22):7617-7625.

- Evans, HF. 1986. Ecology and epizootiology of baculoviruses. In: Granados, RR, Federeci, BA (eds). The Biology of Baculoviruses. Boca Raton, CRC Press. p.89-132.
- FAOSTAT. 2016. Food and Agriculture Organization. FAOSTAT Database. Consultado 6 de abr. 2016. Disponible en [www. http://www.fao.org/faostat/en/#data](http://www.fao.org/faostat/en/#data)
- Friesen, PD. 2007. Insect viruses. In Knipe, DM; Howley, PM; Griffin, DE; Lamb, RA; Martin, MA; Roizman, B; Straus, SE. (eds). Virology. 5 ed. Lippincott Williams and Wilkins. p.443-472.
- Funk, CJ; Braunagel, SC; Rohrmann GF. 1997. Baculovirus structure. In Miller, LK (ed). The Baculoviruses, Plenum Press. p. 7-32.
- Fuxa, JR. 2004. Ecology of insect nucleopolyhedroviruses. Agriculture, Ecosystems & Environment 103:425-442.
- Gómez J; Villamizar, L; Espinel, C; Cotes, A. 2009. Comparación de la eficacia y la productividad de tres granulovirus nativos de *Tecia solanivora* (Povolny) (Lepidoptera: Gelechiidae). Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecu. 10(2):152-158.
- Gómez-Bonilla, Y; Léry, X; López, M; Caballero, P; Muñoz, D. 2011a. Characterization of a Costa Rican granulovirus strain highly pathogenic against its indigenous hosts, *Phthorimaea operculella* and *Tecia solanivora*. Entomol. Exp. Appl. 140: 230-246.
- Gómez-Bonilla, Y; López, M; Caballero, P; Lery, X; Muñoz, D. 2011b. Costa Rican soils contain highly insecticidal granulovirus strains against *Phthorimaea operculella* and *Tecia solanivora*. Journal of Applied entomology. 136(7):530-538.
- Gomez-Valderrama J; Herrera, L; Uribe, D; López-Ferber, M; Villamizar, L. 2014. An immunological method for granulovirus detection in larvae of *Tuta absoluta*: searching for isolates with prospects for biological control of this pest in Colombia. International Journal of Pest Management 60(2):136-143.
- Gomez-Valderrama J; Villamizar L. 2013. Baculovirus: Hospederos y especificidad. Revista Colombiana de Biotecnología 15 (2): 143-155.
- Harrison, R. 2009. Structural divergence among genomes of closely related baculoviruses and its implications for baculovirus evolution. Journal of Invertebrate Pathology 101:113-118.
- Hitchman R; Hodgson, D; King, L; Hails; Cory; J. 2007. Phenotypic variation between naturally coexisting genotypes of Lepidopteran baculovirus. Evolutionary Ecological Research 3:687-701.
- Hogdson, D; Hitchman, R; Vanbergen, A; Hails, R; Possee, R; Cory, J. 2004. Host ecology determines the relative fitness of virus genotypes in mixed-genotype nucleopolyhedrovirus infections. J. Evol. Biol. 17:1018-1025.
- Ignoffo, M. 1968. Specificity of insect viruses. Bull. Soc. Entom. 14(2):33-40.
- Inceoglu, AB; Kamita, SG; Hinton, AC; Huang, Q; Severson, TF; Kang, K; Hammock, BD. 2001. Recombinant baculoviruses for control. Pest Manag. Sci. 57:981-987.
- IPPC (International Plant Protection Convention). 2015. Pest reports from Costa Rica (en línea). Consultado 26 abr. 2021. Disponible en <https://www.ippc.int/es/countries/costa-rica/pestreports/>
- Jehle, JA; Blissard, BC; Bonning, JS; Cory EA, Herniou, GF; Rohrmann, DA; Theilmann, SM; Thiem, SM; Vlask, JM. 2006. On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. Arch. Virol. 151:1257-1266.
- Lery, X; Abol-ela, S; Giannotti, J. 1998. Genetic heterogeneity of *Phthorimaea operculella* granulovirus: restriction analysis of wild-type isolates and clones obtained in vitro. ActaVirologica 42:13-21.
- Lobo, M; Batista, M; Moscardi, F. 2007. Virus for the Biological Control of Insects. In Taylor y Francis (eds). Baculovirus Pesticides: Present state and future perspectives. p. 689-692.
- López, L. 2017. Generalidades de la agrocadena de tomate (*Solanum lycopersicum*) (en línea). Memoria del 4° Congreso Nacional del Cultivo de Tomate. Cartago, Costa Rica. 40 p. Consultado 26 abr. 2021. Disponible en <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/A50-10881.pdf>

- McNeil, J; Cox-Foster, D; Slavicek, J; Hoover, K. 2010. Contributions of immune responses to developmental resistance in *Lymantria dispar* challenge with baculovirus. *Journal of Insect Physiology* 56:1167-1177.
- Moura, G; Alves, S; Rampelotti-Ferreira, F; Ragassi, M; Borges, C; Delalibera, I. 2010. Potential of granulovirus isolate to control *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae). *BioControl* 55:657-671.
- Murillo, R; Elvira, S; Muñoz, D; Williams, T; Caballero, P. 2006. Genetic and phenotypic variability in *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus isolates from greenhouse soils in the southern Spain. *Biol. Control* 38:157-165.
- Ojeda, Z; Rocha, P; Calvache, H. 2002. Baculovirus como insecticida biológico. *Palmas* 24(3):27-37.
- Picanco, M; Guedes, RN; Leite, G; Fontes, P; Silva, E. 1995. Incidencia de *Scrobipalpus absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) em tomateiro sob diferentes sistemas de tutoramento e controle químico de pragas. *Hort. Bras.* 13:180-183.
- Richards, A; Christian, P. 1999. A rapid bioassays screen for quantifying nucleopolyhedrovirus (Baculoviridae) in the environment. *J. Virol. Methods* 82:63-75.
- Roditakis, E; Skarmoutso, U; Staurakaki, M. 2012. Toxicity of insecticides to populations of tomato borer *Tuta absoluta* (Meyrick) from Greece. *Pest Manag Sci.* 69:834-840.
- Rosenheim, JA; Hoy, MA. 1989. Confidence intervals for the Abbott's formula correction of bioassay data for control response. *Journal of Economic Entomology* 82:331-335.
- Sparks, W; Bartholomay, L; Bonning, B. 2008. Insect Immunity to viruses. *In*: Beckage, NE. (ed). *Insect Immunology*. Elsevier Academic Press. p. 209-242.
- Theilmann, DA; Blissard, GW; Bonning, B; Jehle, J; O'Reilly DR. 2005. Family: Baculoviridae. *In* Fauquet C; Mayo MA; Maniloff, J; Desselberger, U; Ball, LA (eds). *Virus Taxonomy*. Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press. p 177-186.
- Trudeau D; Washburn, JO; Volkman, LE. 2001. Central role of hemocytes in *Autographa californica* M. nucleopolyhedrovirus pathogenesis in *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea*. *J Virol* 75:996-1003.
- Wang, P; Granados R. 2000. Calcofluor disrupts the midgut defense system in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30:135-143.
- Van Beek, N; Davis, DC. 2007. Baculovirus insecticide production in insect larvae. *Methods Mol. Biol.* 30:135-143.
- Williams, T. 2002. Diseño y aplicación de los bioinsecticidas basados en baculovirus. *Phytoma* 144:24-27.
- Zeddami, J; Vásquez, M; Vargas, Z; Lagnaoui, A. 2003. Producción viral y tasas de aplicación del granulovirus usado para el control biológico de las polillas de la papa *Phthorimaea operculella* y *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Plagas* 29:659-667.

DISPONIBILIDAD Y CALIDAD NUTRITIVA DEL PASTO KIKUYO EN PASTOREO ROTACIONAL

William Sánchez Ledezma¹, José Antonio Guada Vallepuga², Antonio de Vega Gancía²

RESUMEN

Disponibilidad y calidad nutritiva del pasto kikuyo en pastoreo rotacional. El objetivo fue determinar la disponibilidad de materia seca (MS) y la calidad nutritiva del pasto kikuyo (*Kikuyuochloa clandestina*) manejado en pastoreo rotacional a intervalos de 30 días, durante la época seca y lluviosa y bajo diferentes condiciones agroecológicas de la región Central de Costa Rica. El estudio se realizó en tres fincas comerciales ubicadas a 1800, 2350 y 2700 m s.n.m.. El muestreo del pasto se realizó mediante el método de rango de peso seco y los datos se analizaron utilizando un modelo factorial 3x2 (3 altitudes x 2 épocas), en el que la altitud y la época son los factores fijos y el de muestreo jerarquizado a época como factor aleatorio. La disponibilidad de MS fue similar entre altitudes, pero diferente ($p = 0,0005$) entre la época lluviosa ($3,0 \pm 0,08$ t MS/ha) y seco ($2,35 \pm 0,14$ t/ha). La calidad nutritiva varió poco a lo largo del año y entre altitudes, con excepción del contenido de MS que fue mayor ($p < 0,0001$) en la época seca ($18,8 \pm 0,55\%$) que en la húmeda ($14,6 \pm 0,39\%$). La Digestibilidad *in vitro* de la Materia Seca (DIVMS) tendió a ser algo mayor ($P = 0,0947$) en la época seca que en la lluviosa (73 y 69%). Se concluye que la disponibilidad de MS varía entre los periodos de lluvias y de sequía, pero que esa diferencia es independiente de la altitud de la zona, excepto a los 2700 m s.n.m., donde la disponibilidad de MS se reduce significativamente en comparación con los sitios de menor altitud. Por otra parte, la composición química y el valor nutritivo del pasto es poco variable a lo largo del año y entre altitudes, con escasas variaciones en digestibilidad, lo que hace improbable una limitación en el aporte de proteína en función de su contenido energético.

Palabras clave: kikuyo, kikuyuochloa, pastos, materia seca y calidad nutritiva.

Keywords: kikuyu, kikuyuochloa, grasses, dry matter and nutritional quality.

1 Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria, INTA. Costa Rica. wsanchez@inta.go.cr. Sede Central del MAG, Sabana Sur.

2 Universidad de Zaragoza, España. jguada@unizar.es y avega@unizar.es. Facultad de Veterinaria, ciudad de Zaragoza.

INTRODUCCIÓN

En Costa Rica, el pasto kikuyo (*Kikuyuochloa clandestina*) predomina en las fincas de lechería especializadas ubicadas en la zona alta, en las faldas de la Cordillera Volcánica Central. Su fácil propagación, hábito de crecimiento y persistencia, hacen que hoy en día existan praderas con más de 35 años de establecimiento. Su principal uso es el pastoreo rotacional, con $\frac{1}{2}$ a 1 día de ocupación e intervalos de 28 a 45 días de descanso, aunque lo común es pastoreo rotacional de $\frac{1}{2}$ día tras 30 días de descanso.

El kikuyo es un pasto tropical con metabolismo fotosintético C_4 , muy fácil de implantar mediante semilla vegetativa, aunque en otras latitudes existen otros cultivar que se siembra mediante semilla sexual (Álvarez *et al.* 2008). La planta de kikuyo es perenne, vigorosa y de porte medio, con raíces profundas y extensas. Crece en rizomas y estolones con elongación horizontal, produciendo gran cantidad de estolones y tallos semirectos, que con el tiempo se vuelven rectos (Bernal 1991). Es susceptible a las heladas (Bernal 1991) lo que, aunado al estrés hídrico, reduce su disponibilidad hasta en 50% en las zonas de mayor altitud durante los meses de diciembre a marzo (Sánchez y Mesén 2010).

Desde que se introdujo en Costa Rica en 1920 con fines experimentales (Sáenz 1970), se han realizado varios estudios sobre el pasto kikuyo. Los más frecuentes se han orientado hacia su disponibilidad y calidad nutritiva en respuesta a la fertilización química y orgánica. Los trabajos han

sido muy específicos, valorando un determinado sitio y época del año, pero sin aportar información suficiente sobre la continuidad del comportamiento durante el resto del año, incluyendo las diferentes altitudes, temporadas y precipitaciones. Estos trabajos revelan que la disponibilidad de materia seca (MS) oscila entre 22,5 y 29,6 t /ha/año, con contenido en proteína cruda (PC) entre el 17,4 y 23% y valores medios de Energía Neta de Lactación (EN) y Digestibilidad *in vitro* de la MS (DIVMS) de 1,53 Mcal/Kg MS y 65,4%, respectivamente (Sánchez 2007; Mesén y Sánchez 2006; Andrade 2006).

A pesar de las variadas investigaciones y validaciones realizadas con el pasto kikuyo en Costa Rica, actualmente es escasa la información acerca del efecto de la época del año y la altitud sobre la disponibilidad y calidad del pasto en las zonas altas lechera de nuestro país, así como sobre la evolución de su crecimiento, la disponibilidad y calidad durante cada rotación y temporada del año. Esta información es indispensable, tanto para optimizar el manejo del pasto, como para planificar la alimentación del ganado de acuerdo con la disponibilidad y calidad del mismo y los requerimientos de los animales.

El objetivo de esta investigación fue determinar la disponibilidad de MS y la calidad nutritiva del pasto kikuyo manejado en pastoreo rotacional a intervalos de 30 días en diferentes condiciones agroecológicas y durante la época seca y lluviosa.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en tres fincas comerciales de lechería especializada representativas de la Región Central de Costa Rica, ubicada en la Cordillera Volcánica Central del país, específicamente en los poblados de Cot, Santa Rosa y San Juan de Chicué de los cantones de Oreamuno y Central, provincia de Cartago.

Las fincas seleccionadas se ubican en sitios agroecológicamente diferentes, entre 1800 y 2700 m s.n.m., en las coordenadas 9°94'12" y 9°89'96" latitud norte y 83°85'15" y 83°87'80" longitud oeste. En la Cuadro 1 se detallan las características agroecológicas más sobresalientes de cada localidad.

Cuadro 1. Características agroecológicas de las tres localidades donde se ubican las fincas en estudio, Región Central Oriental de Costa Rica.

Característica	Poblado		
	Cot	Pacayas	San Juan Chicué
Altitud (m s.n.m.) ¹	1800	2250	2700
Zona de vida ¹	bh-MB	bmh-MB	bmh-M
Precipitación (mm/año) ²	2700	2500	2000
Temperatura (°C) ²	12-25	10-23	9-20
Tipo de suelo ³	Andisol	Andisol	Andisol

Fuente: ¹Bolaños, R.; Watson, V. 1993; ²IMN 2012; ³CIA-UCR. 2016.

Las tres fincas se ubican en pisos altitudinales de montano a montano bajo, con zonas de vida de bosque húmedo a muy húmedo (Bolaños y Watson 1993). Los suelos son profundos de origen volcánico del orden de los Andisoles (Bertsch 1987a).

En las tres fincas predomina el kikuyo (*Kikuyuochloa clandestina*) como especie principal manejado en pastoreo rotacional, con aprovechamientos de medio día a intervalos de 30 días de descanso. Los apartos seleccionados para el estudio se establecieron hace aproximadamente 20 años y reciben una fertilización a base de 250, 50 y 50 kg/ha de N, P₂O₅ y K₂O, respectivamente. La dosis anual de N se administró durante la estación lluviosa, distribuida en fracciones iguales después de cada rotación, mientras que la dosis de fósforo y de potasio se distribuyó en dos partes iguales de cada nutriente, la primera al inicio de la época lluviosa (mayo) y la segunda cuatro meses después (octubre).

La disponibilidad de biomasa anual se determinó en dos apartos representativos de cada finca, realizando mediciones mensuales el día antes de cada pastoreo durante la época seca y de lluviosa del año 2012. En cada medición, se registró la altura del pasto y la disponibilidad de biomasa. La altura se midió en centímetros desde el suelo hasta el punto más alto de la planta sin

estimarla (Toledo y Schultze-Kraft 1982), mientras que la biomasa se determinó por el método Botanal (Haydock y Shaw 1975).

Las determinaciones reales de biomasa se llevaron a cabo mediante la corta de un área de 0,25 m² a 5 cm de altura en cinco puntos de referencia del pasto, seleccionados visualmente para diferentes niveles de disponibilidad en una escala de 1 a 5, obteniéndose una regresión lineal entre la disponibilidad de MS real (Y) y el valor asignado visualmente (X). La apreciación visual del pasto se llevó a cabo mediante la puntuación de 1 a 5 de 40 observaciones del mismo seleccionadas al azar, siguiendo un recorrido en “zigzag” por el aparto. Finalmente, la disponibilidad de materia seca ponderada para toda el aparto se calculó mediante la siguiente ecuación (Haydock y Shaw 1975):

$$D_{MS} = Y\mu + B(X^1\mu - X\mu), \text{ donde;}$$

$$D_{MS} = \text{Disponibilidad de MS.}$$

$Y\mu$ = promedio de biomasa de las muestras reales.

B = Coeficiente de la regresión lineal.

$X\mu$ = Promedio de las notas asignadas a las muestras reales (3).

$X^1\mu$ = Promedio de las notas asignadas a las muestras visuales.

Análisis de laboratorio

El contenido de MS se obtuvo por pérdida de peso tras la desecación de $1,0 \pm 0,1$ kg de pasto verde en estufa a 105°C por 48 horas. La proteína cruda (PC) se determinó como nitrógeno $\times 6,25$ mediante el método macro Kjeldahl (AOAC 1980) empleando como catalizador CuSO_4 , un digestor y un equipo de destilación automático para las sucesivas operaciones de digestión, destilación y valoración. El extracto etéreo (EE) se determinó por extracción con éter de petróleo mediante el método Soxhlet (AOAC 1990). La fibra neutro detergente (FND), la fibra ácido detergente (FAD) y la lignina se determinaron en secuencia mediante el procedimiento propuesto por Van Soest (1991). También se determinó el contenido de N de los residuos de FND y FAD de las muestras mensuales mediante el método Kjeldahl (AOAC 1980) descrito anteriormente. La Digestibilidad *in vitro* de la Materia Seca (DIVMS) se determinó según la técnica de Van Soest & Robertson (1979).

La EM y la EN_l de las muestras mensuales de pasto se estimaron mediante las fórmulas propuestas para vacuno de leche por el NRC (2001), calculando primero la energía digestible y posteriormente la EM y finalmente EN_l con las siguientes fórmulas:

$$\text{ED} = [(\text{tdNFC}/100) \cdot 4,2 + (\text{tdNDF}/100) \cdot 4,2 + (\text{tdCP}/100) \cdot 5,6 + \text{FA}/100 \cdot 9,4] - 0,3$$

$$\text{EM} = 1,01 \cdot \text{ED} - 0,45 + 0,0046 \cdot (\text{EE} - 3)$$

$$\text{EN}_l = 703 \cdot \text{EM} - 0,19$$

ED = energía digestible, **EM** = energía metabolizable, **EN_l** = energía neta de lactación,

Donde:

$$\text{tdNFC} = 0,98 (100 - [(NDF - \text{NDICP}) + \text{CP} + \text{EE} + \text{Ash}]) \cdot \text{PAF}$$

$$\text{tdCP} = \text{CP} \cdot \exp[1,2 \cdot (\text{ADICP}/\text{CP})]$$

$$\text{tdFA} = \text{FA}; \text{ si } \text{EE} < 1 \text{ entonces } \text{FA} = 0$$

$$\text{tdNDF} = 0,75 \cdot (\text{NDF}_n - L) \cdot [1 - (L/\text{NDF}_n)^{0,667}]$$

$$\text{NDF}_n = \text{NDF} - \text{NDICP}$$

tdNFC = digestibilidad verdadera de los carbohidratos no fibrosos, **tdCP** = digestibilidad verdadera de la proteína bruta, **tdFA** = digestibilidad verdadera de los ácidos grasos, **tdNDF** = digestibilidad verdadera de la fibra neutro detergente (NDF), **NDF_n** = fibra neutro detergente corregida para el contenido en N, **FA** = ácidos grasos (i.e., EE-1), **EE** = extracto etéreo, **NDICP** = proteína bruta insoluble en detergente neutro (N-FND $\times 6,25$), **CP** = proteína bruta, **Ash** = cenizas. **PAF** = factor de ajuste del procesado que se igualó a 1, **ADICP** = proteína bruta insoluble en detergente ácido (N-FAD $\times 6,25$, **L** = lignina. Todos los valores expresados como porcentaje de la MS

Análisis estadístico

La disponibilidad de MS y la composición química del pasto se estudió a partir de los registros de disponibilidad mensual que se sometieron a un análisis de varianza mediante el procedimiento MIXED del SAS (2002), como un modelo factorial 3×2 (3 altitudes \times 2 épocas), según el siguiente modelo en el que los efectos de A y E se consideraron como factores fijos y el de M jerarquizado a E como factor aleatorio.

$$y_{ijk} = \mu + A_i + E_j + (\text{AE})_{ij} + M_k(E_j) + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

y_{ijk} = variable dependiente.

μ = media.

A_i = Altitud de las fincas ($i = 1800, 2350$ y 2700 m).

E_j = Época de cosecha ($j = \text{seca}$ y lluviosa).

$M_k(E_j)$ = Registro mensual ($k = 1$ a 12) jerarquizado a época y utilizado como término del error para el contraste del efecto de E.

ε_{ijk} = Varianza residual o término del error para el contraste de los efectos de A y de AE.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Altura del pasto

La altura del pasto medida en centímetros varió entre épocas ($p = 0,0078$) y altitudes ($p = 0,0004$) de forma independiente. Durante el año, el promedio mensual de crecimiento del kikuyo fue de 34,8 cm; sin embargo, su crecimiento se redujo en 14,7% durante la época seca ($29,7 \pm 1,88$ cm) y aumentó en 7% durante la época lluviosa ($37,3 \pm 1,33$ cm) con respecto al promedio, esto debido al estrés hídrico que se presenta durante la época

seca y adecuada humedad en el suelo y disponibilidad de nutrientes durante el periodo lluvioso.

Durante el año de evaluación, la altura del pasto fue mayor ($p= 0,034$) a los 2350 que a 1800 m s.n.m. ($37,6$ vs $33,7 \pm 1,51$ cm) y menor en el sitio de mayor altitud ($29,2 \pm 1,51$ cm) (Cuadro 3). Aunque como se observa en la Figura 1 A; esta diferencia es de mayor magnitud en la época seca que en la lluviosa.

Cuadro 3. Altura y disponibilidad de MS por época del pasto kikuyo a intervalos de 30 días, en tres diferentes altitudes de la zona lechera de Cartago, Costa Rica (2015).

Variable	Época lluviosa (n= 8)			EE		Época seca (n= 4)			EE
	Altitud (m s.n.m.)					Altitud (m s.n.m.)			
	1800	2350	2700			1800	2350	2700	
Altura del pasto (cm)	37,7	39,6	34,6	1,75		29,7	35,5	23,9	2,47
Disponibilidad de MS (t/ha/30 d)	2,89	3,01	3,09	0,09		2,54 ^a	2,46 ^a	2,02 ^b	0,13

EE= Error estándar de las medias de altitud en época seca y lluviosa; cm= centímetros; MS= toneladas de materia seca por hectárea cada 30 días; valores con letras iguales en una misma línea y época, no tienen diferencias significativas ($p \geq 0,05$).

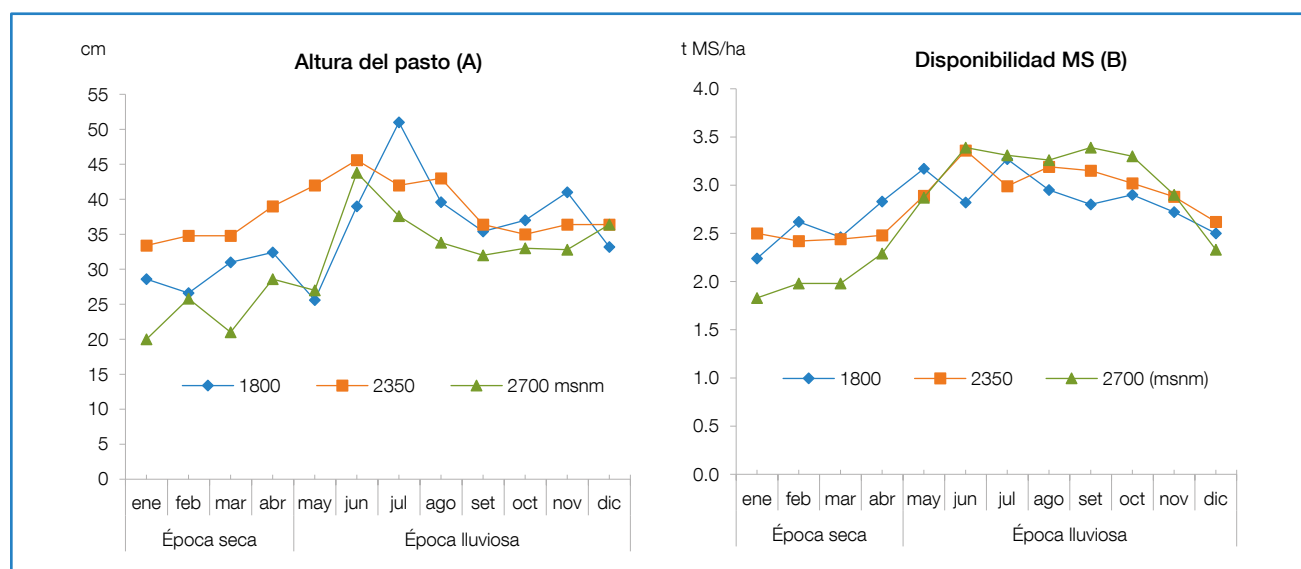


Figura 1. Altura (A) y disponibilidad de materia seca (B) del pasto kikuyo en pastoreo rotacional de 30 días, en tres diferentes altitudes de la zona lechera de Cartago, Costa Rica (2015).

Disponibilidad de materia seca

Cuando el crecimiento del pasto se midió en términos de disponibilidad de MS, se determinó que la interacción época x altitud fue significativa ($p = 0,0005$) a pesar de que en la época lluviosa no hubo diferencia entre altitudes ($3,0 \pm 0,08$ t/ha); mientras que en la época seca, la disponibilidad fue menor ($p < 0,005$) a los 2700 m s.n.m. ($2,02$ t/ha) que a los 1800 y 2250 m s.n.m. ($2,54$ y $2,46$ t/ha), como se detalla en el Cuadro 3 y la Figura 1 B).

La disponibilidad de MS fue afectada por la época y la altitud. En el caso de la época, debido a la influencia de la humedad en el suelo; mientras que las diferencias por altitud, obedecen a la disminución de la disponibilidad de MS en el sitio de mayor altitud (2700 m s.n.m.) durante el periodo seco, a causa del efecto de la escarcha durante los primeros meses del año en las partes más altas de Costa Rica (Sánchez y Mesén 2010).

La disponibilidad anual de MS fue de $32,5$ t/ha/año, de las cuales el 28 y el 72% corresponden a la época seca y lluviosa, respectivamente. Estos valores son inferiores a las $38,7$ t/ha/año registradas por Villalobos *et al.* (2013) en la misma zona de Cartago a edades de rebrote semejantes, pero superiores a las $25,2$ y $21,1$ t/ha/año observadas en Australia (Neal *et al.* 2009) y en la costa sur de Italia (Gherbin *et al.* 2007), respectivamente.

En un estudio realizado en Costa Rica por Andrade (2006) en pasto kikuyo a los 45 días de

rebrote, se reporta valores superiores de MS ($7,2$ t/ha) a los obtenidos en la presente investigación. Aunque en otros trabajos realizados también en nuestro país (Mesén y Sánchez 2006; Villalobos *et al.* 2013) a los 30 días de crecimiento, se citan valores entre $1,9$ y $3,5$ t/ha; similar a los encontrado en este estudio.

En Colombia y Venezuela, dos de los países de América del Sur donde más se utiliza el kikuyo en pastoreo, se han observado disponibilidades de MS que varían entre $1,12$ y $4,65$ t/ha para 28 y 35 días de rotación, respectivamente (Mojica *et al.* 2009; Machado y Dávila 1998; Soto *et al.* 2005; Correa *et al.* 2008).

Es importante mencionar, que estas diferencias en disponibilidad de MS, tanto por ciclo de pastoreo como por año, probablemente se deban a las distintas edades de cosecha, condiciones de clima y de manejo existentes entre un estudio y otro.

Composición química y valor nutritivo

Los resultados de la composición química y el valor nutritivo del kikuyo, muestreado cada 30 días se presentan en el cuadro 4, ordenado por época (seca y lluviosa) y altitud (1800, 2350 y 2700 m s.n.m.).

Cuadro 4. Composición química y valor nutritivo por época del pasto kikuyo a intervalos de 30 días, en tres diferentes altitudes de la zona lechera de Cartago, Costa Rica (2015).

Variable calidad	Época lluviosa (n= 8)			EE	Época seca (n= 4)			EE
	Altitud (m s.n.m.)				Altitud (m s.n.m.)			
	1800	2350	2700		1800	2350	2700	
Materia seca (%)	14,8	13,9	14,9	0,59	18,0	17,6	20,8	0,83
Proteína cruda (%)	18,8 ^b	19,6 ^b	21,4 ^a	0,45	18,5 ^{bc}	18,6 ^{bc}	17,2 ^c	0,64
Fibra neutro detergente (%)	66,9	67,8	65,1	1,59	65,4	65,5	62,9	2,24
Fibra ácido detergente (%)	31,8	30,8	29,4	0,70	29,7	31,1	29,6	1,00
Lignina (%)	3,20	3,04	2,83	0,21	2,73	3,18	3,18	0,30
Digitibilidad de MS (%)	65,7	70,7	70,8	2,52	72,3	76,0	70,7	3,56
Energía metabolizable (Mcal/kg MS)	2,32	2,30	2,31	0,04	2,34	2,38	2,29	0,05
Energía neta de lactación (Mcal/kg MS)	1,45	1,43	1,44	0,03	1,46	1,49	1,42	0,04

EE= Error estándar de las medias de altitud en época seca y lluviosa; MS= materia seca.

Materia seca

El contenido en materia seca del pasto kikuyo fue menor ($p < 0,0001$) en la época de lluvias ($14,6 \pm 0,39\%$) que en la seca ($18,8 \pm 0,55\%$) y mayor ($p < 0,0156$) a los 2700 m s.n.m. ($17,9\%$) que a los 2350 y 1800 m s.n.m. ($15,8$ y $16,4 \pm 0,51\%$).

En la Figura 2 A se muestra la evolución mensual del contenido de MS y, aunque en ella la diferencia entre altitudes es más marcada en la época seca que en la lluviosa, la interacción época x altitud no resultó ser estadísticamente significativa ($p = 0,1340$). El promedio anual de MS fue 16%, con valor mínimo y máximo de 11,3 y 22%, respectivamente (cuadro 5), valores extremos que se presentaron durante los meses de agosto y marzo, respectivamente (figura 2 A).

Cuadro 5. Promedio anual, valor máximo y mínimo de la disponibilidad de MS y la composición química del pasto kikuyo, en la zona lechera de Cartago, Costa Rica (2015).

Variable calidad	Mínimo	Máximo	Promedio	EE	CV (%)
Disponibilidad de MS (t/ha/año)	24,0	37,2	33,6	0,42	6,48
Materia seca (%)	11,3	22,0	16,0	2,71	9,64
Proteína cruda (%)	15,4	25,4	19,4	2,24	7,21
Fibra neutro detergente (%)	57,5	76,1	65,9	4,43	5,07
Fibra ácido detergente (%)	26,6	34,7	30,5	2,07	6,58
Lignina (%)	2,10	3,80	2,95	0,42	15,89
Digestibilidad <i>in vitro</i> de la MS (%)	50,5	83,0	70,4	7,25	10,8
Energía Metabolizable (Mcal/kg MS)	2,14	2,62	2,32	0,10	3,65
Energía Neta Lactación (Mcal/kg MS)	1,32	1,66	1,44	0,07	4,27

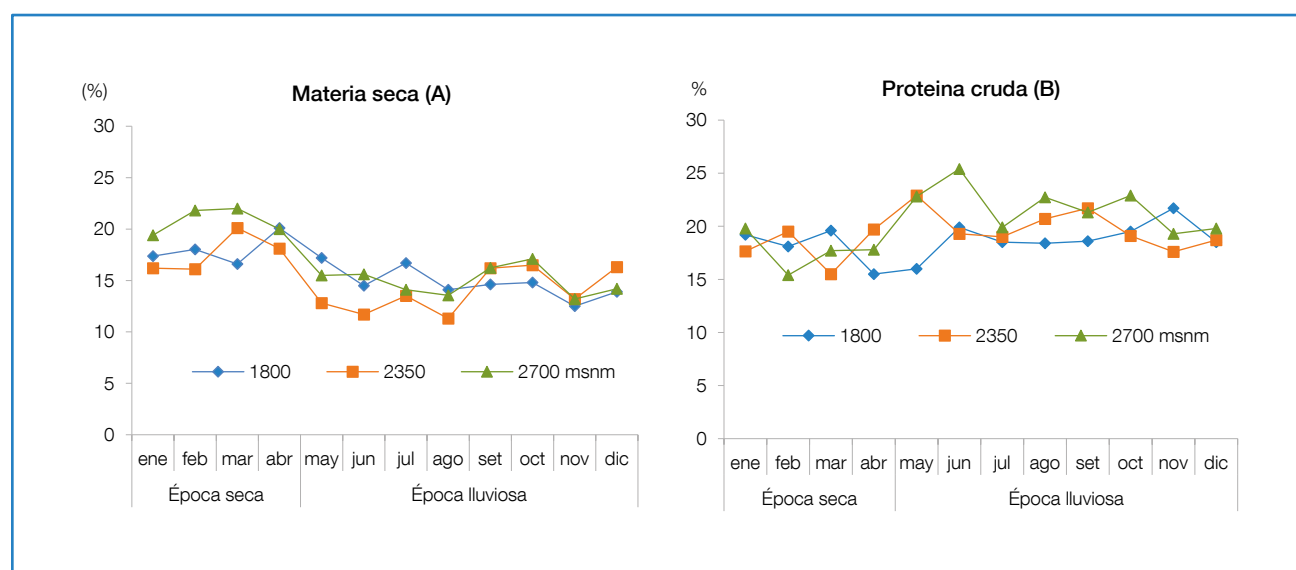


Figura 2. Contenido de materia seca (A) y proteína cruda (B) del pasto kikuyo en pastoreo rotacional cada 30 días, en tres altitudes de la zona lechera de Cartago, Costa Rica (2015).

Los bajos contenidos de MS obtenidos son similares a los reportados por Sánchez (2007) y Peters (2008) en Costa Rica en condiciones climáticas semejantes. Aunque Soto *et al.* (2005) reportan un rango más alto (18 y 20,1%) en Colombia, al igual que Apraez *et al.* (2007) en México (15,2 y 18%), diferencias que probablemente se deban al menor régimen de lluvias que existen en estos países en comparación a Costa Rica.

Con respecto a los bajos contenidos de MS, Van Soest (1992) argumenta que esa situación puede condicionar la ingestión voluntaria de MS, debido a la restricción física ejercida por el agua intracelular o a su efecto negativo sobre la palatabilidad y el tiempo de pastoreo (Butris and Phillips 1987). Al respecto, Gibb and Treacher (1984) mencionan que dicho efecto fue observado en ganado ovino en pastoreo. Aunque según Osoro y Cebrian (1989), el efecto es posible solo en pastos con digestibilidad superior al 70%, por debajo de cuyo valor la ingestión de MS estaba positivamente relacionada con la digestibilidad.

Proteína cruda

El contenido de PC fue mayor ($p = 0,0005$) durante la época lluviosa que en la seca ($19,9 \pm 0,21\%$ vs $18,1 \pm 0,30\%$), aunque la diferencia se debió a los valores extremos alcanzados en las épocas de lluvia (21,4%) y seca (17,2%) a los 2700 m s.n.m. (Cuadro 3 y Figura 2B), lo que se reflejó en la diferencia significativa que presentó la interacción época x altitud ($p = 0,0100$).

Estos valores se encuentran en el rango obtenido en la mayoría de los estudios realizados en Costa Rica (Castillo 1983; Dormond *et al.* 1998; Mesén y Sánchez 2006; Sánchez 2007; Arce 2008; Sánchez, *et al.* 2014), quienes citan valores entre 16,0 y 23,0% para kikuyo cosechado entre 28 y 35 días de rebrote. Aunque otros investigadores (Sánchez *et al.* 1985; Villalobos *et al.* 2013)

han encontrado porcentajes inferiores (entre 12 y 14,9%) a la misma frecuencia de corte y condiciones climáticas semejantes.

En Colombia, Venezuela y México también se han observado contenidos semejantes de PC (entre 17,6 y 22%) a la misma frecuencia de rebrote (Soto *et al.* 2005; Aguilar *et al.* 2009; Correa *et al.* 2008; Mojica *et al.* 2009).

Por otra parte, algunos autores (Soto *et al.* 2005) no reportan cambios significativos en el contenido de PC del pasto kikuyo antes de los 45 días de crecimiento, mientras que Aguilar *et al.* (2009) registran variaciones entre 21,8 y 17,8% al comparar kikuyo con 50 y 70 días de rebrote, respectivamente. Al respecto, Zapata (2000) considera que los escasos cambios en la composición química durante los primeros 45 días de crecimiento del pasto kikuyo, se deben a la alta relación hojas:tallo que presenta el pasto, la cual varía poco durante dicho periodo.

Es importante anotar que, a pesar de las variaciones obtenidas en el contenido de PC, los porcentajes logrados son superiores a 12,3%, lo que no afecta el consumo voluntario ni la capacidad del retículo-rumen y la tasa de pasaje de la ingesta (Allison 1985). Además, estos valores no limitan el crecimiento microbiano en el rumen, siempre y cuando exista un aporte energético balanceado en la dieta total (Cowan and Lowe, 1998).

Fibra neutro detergente, fibra ácido detergente y lignina

El contenido de la pared celular varió a lo largo del año, con valores de FND que oscilaron entre 58,6 y 64,5%, de FAD entre 27,2 y 35,5% y de lignina entre 2,1 y 3,80%; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre épocas ni entre altitudes para ninguno de los tres componentes (Cuadro 4 y Figura 3).

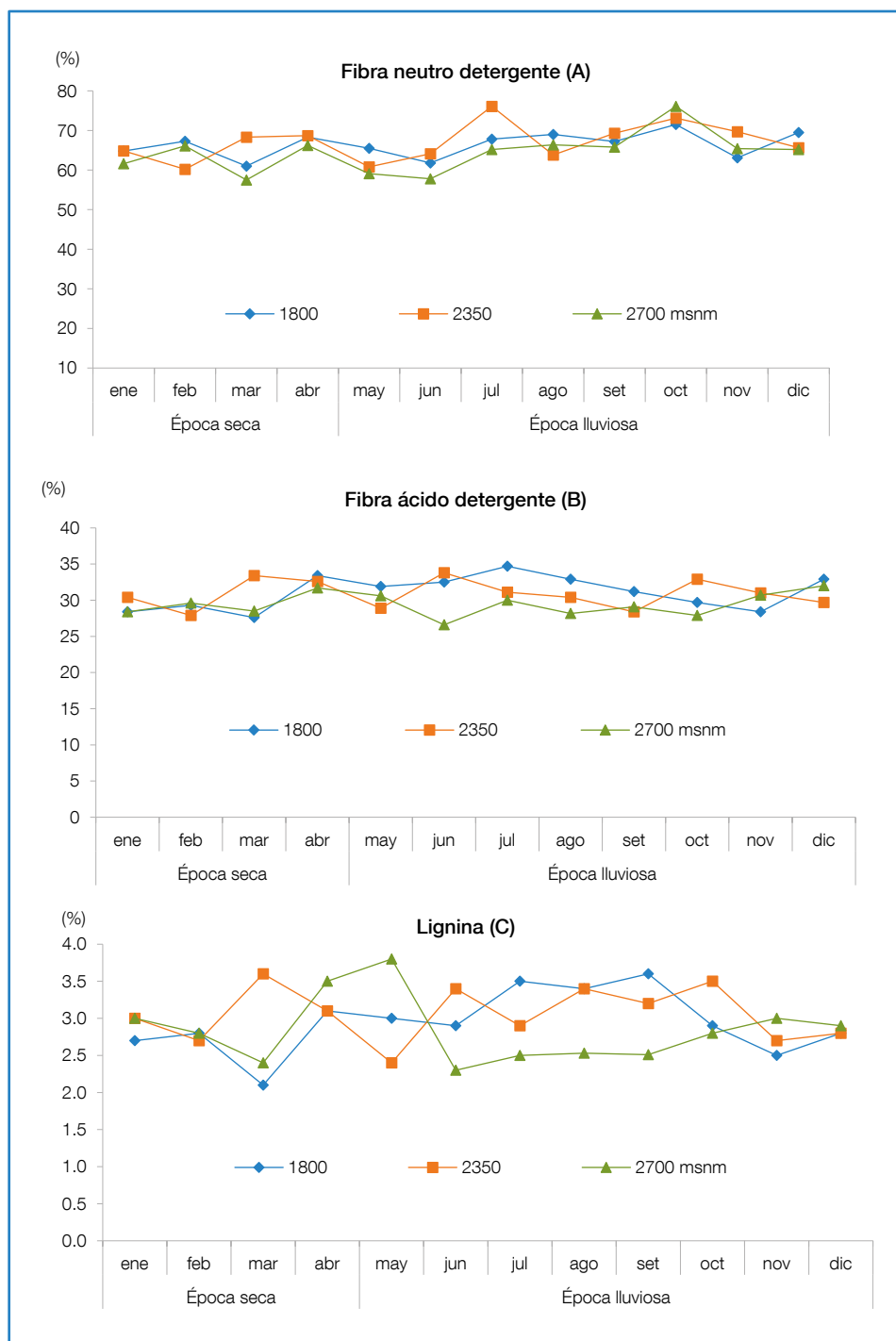


Figura 3. Contenido de fibra neutro detergente (A), fibra ácido detergente (B) y lignina (C) anual del pasto kikuyo en pastoreo rotacional cada 30 días, en tres altitudes de la zona alta lechera de Cartago, Cartago, Costa Rica (2015).

En estudios realizados en Costa Rica (Sánchez *et al.* 2014; Peters 2008; Arce 2008) se reportan valores de FND que oscilan entre 58,6 y 64,5%, y de FAD entre 27,2 y 35,5%, semejantes a los obtenidos en la presente investigación. Aunque en otros trabajos realizados también en nuestro

país (Castillo 1983; Dormond *et al.* 1998; Mesén y Sánchez 2006; Sánchez 2007; Sánchez *et al.* 2014) se encontraron porcentajes superiores de FND (entre 64,4 y 75,2%) y FAD (entre 27,2 a 36,0%) en kikuyo cosechado entre los 28 y 35 días de rebrote.

En Colombia, Venezuela y México se han observado contenidos semejantes de FND (entre 54 y 62,4%) y de FAD (entre 29,3 y 36,3%) a los obtenidos en este estudio a la misma edad de rebrote (Soto *et al.* 2005; Aguilar *et al.* 2009; Correa *et al.* 2008; Mojica *et al.* 2009). Aunque en otras latitudes, Correa *et al.* (2008) y Posada *et al.* (2013) encontraron rangos inferiores de FND (entre 40,8 y 58,1%) y de FAD (entre 26,7 y 30,3%) en la misma especie de pasto.

Algunos autores (Soto *et al.* 2005) consideran que el contenido de FND y FAD del pasto kikuyo, no presenta cambios significativos antes de los 45 días de rebrote. Aunque Aguilar *et al.* (2009) encontraron variaciones en el contenido FND (54 y 59,3%) y de FAD (31,1 y 29,3%) al comparar el kikuyo con 50 y 70 días de rebrote, respectivamente.

Es relevante mencionar, que la FND y FAD son componentes de la pared celular de los pastos que limitan el consumo voluntario y la digestibilidad cuando los contenidos son altos, situación que se debe tomar en consideración para evitar que la tasa de pasaje por el tracto digestivo no sea lenta y se reduzca el aporte de nutrientes (Bassi 2006). Al respecto, Holland y Kezar (1995) menciona que la FND y el consumo voluntario son inversamente proporcionales, es decir, entre mayor contenido de FND tenga un pasto, menor será el consumo voluntario y mayor efecto de llenado del rumen, mientras que la FAD se correlaciona negativamente con la fracción no digestible de la pastura, lo que significa que a mayor FAD menor digestibilidad y aprovechamiento de la pastura.

Digestibilidad *in vitro* de la materia seca

La digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) tendió a ser mayor ($p = 0,0947$) en la época seca que en la lluviosa ($73,0 \pm 1,75\%$ y $69,1 \pm 1,24\%$), siendo esta diferencia constante en las tres altitudes, como se aprecia en la figura 4 que muestra la evolución de la DIVMS a lo largo del año en cada altitud.

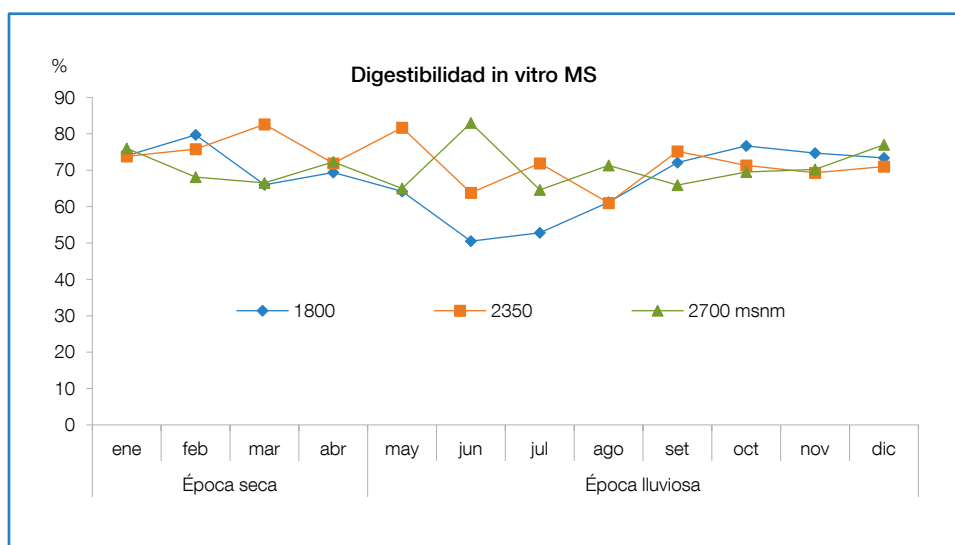


Figura 4. Digestibilidad *in vitro* de la materia seca del pasto kikuyo en pastoreo rotacional cada 30 días, en tres altitudes de la zona alta lechera de Cartago. Costa Rica (2015).

El promedio anual de digestibilidad *in vitro* de la MS del pasto kikuyo fue de 70,4%, con un rango que osciló entre 50,5 y 83% (Cuadro 5). Estos valores son superiores al rango entre 60 y 70,4% reportado en otros estudios realizados en Costa Rica (Andrade 2006; Peters 2008) en condiciones semejantes de clima. En Colombia, Mojica *et al.* (2009) también encontró valores promedios (66,6%) inferiores a los logrados en el presente estudio. Aunque otros autores (Vélez 1987; Laredo y Cuesta 1988; Quiroga y Barreto 2002) citan valores superiores (80 y 79,2%) en la misma especie de pasto.

La digestibilidad de la MS es una de las variables de calidad más importante de una pastura, ya que el aprovechamiento y aporte de nutrientes depende de esta. La digestibilidad del pasto depende de la calidad del material y la cantidad de fibra que contenga; por lo que, entre menor sea el contenido de FND y FAD, mayor será la digestibilidad y aprovechamiento de la misma (Bassi 2006).

Contenido energético

En lo referente a la energía metabolizable (EM) y la energía neta de lactación (EN_L), estimadas según el NRC (2001), se registraron valores medios de $2,32 \pm 0,017$ y $1,44 \pm 0,013$ Mcal/kg MS, respectivamente, que oscilaron a lo largo del año entre 2,14 y 2,62 Mcal/kg MS en el caso de la EM y de 1,66 y 1,32 Mcal/kg MS para la EN_L (figura 5), pero sin que se pudieran identificar diferencias significativas entre altitudes ni entre épocas del año ($p > 0,05$).

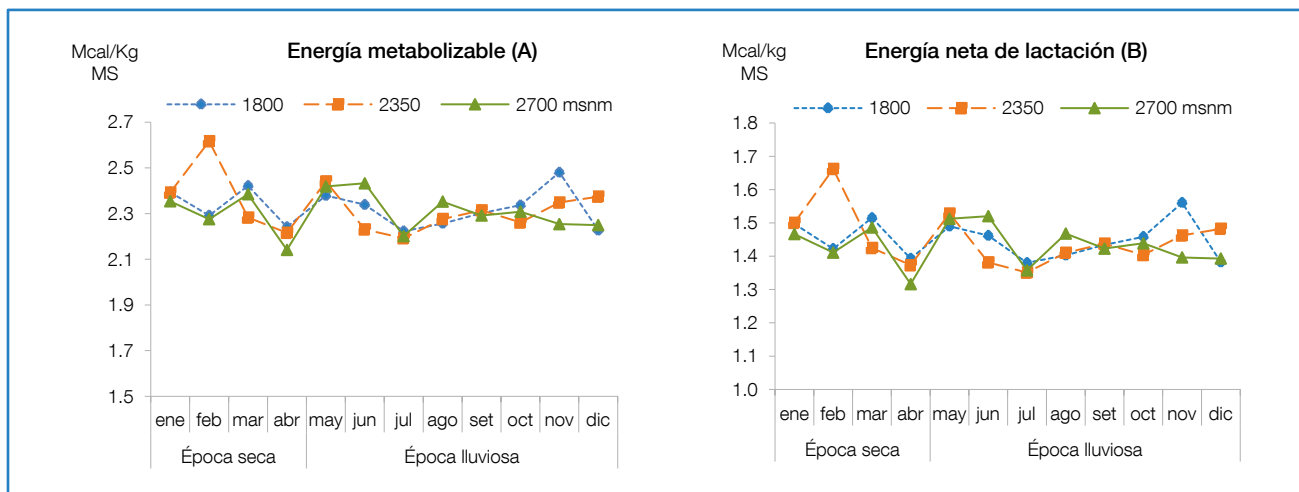


Figura 5. Contenido de energía metabolizable (A) y energía neta de lactación (B) de muestras mensuales de pasto kikuyo en pastoreo rotacional cada 30 días, en tres altitudes de la zona lechera de Cartago, Costa Rica, 2015.

El rango de EN_L encontrados en el presente estudio (1,32 y 1,66 Mcal/kg MS) es superior al reportado (1,3 y 1,4 Mcal/kg MS) por Sánchez (2007) en Costa Rica, y al encontrado en Colombia (1,1 a 1,3 Mcal/kg MS) en varios estudios realizados por Soto *et al.* 2005; Aguilar *et al.* 2009; Correa *et al.* 2008. Aunque también en Colombia, Mojica *et al.* (2009) cita un valor de EN_L superior (1,57 Mcal/kg MS).

Se concluye que la disponibilidad de pasto kikuyo manejado en pastoreo rotacional a intervalos mensuales varía entre los periodos de lluvias y de sequía, pero que esa diferencia es independiente de la altitud de la zona, excepto a los 2700 m s.n.m., donde la disponibilidad de MS se reduce significativamente en comparación a los sitios de menor altitud. Por otra parte, la composición química y el valor nutritivo del pasto es poco variable a lo largo del año y entre altitudes, con escasas variaciones en digestibilidad, lo que hacen improbable una limitación en el aporte de proteína en función de su contenido energético.

LITERATURA CITADA

- Andrade, M. 2006. Evaluación de técnicas de manejo para mejorar la utilización del pasto kikuyo. Tesis Lic. Ing. Agr. San José, CR, UCR. 225 p.
- Aguilar, OX; Moreno, BM; Pabón, ML; Carulla, JE. 2009. Efecto del consumo de kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) o ryegrass (*Lolium hybridum*) sobre la concentración de ácido linoléico conjugado y el perfil de ácidos grasos de la grasa láctea. *Livestock Research for Rural Development* 21:1-15.
- Álvarez, E.; Gracia J.; Rodríguez, R.; Carrillo, G. 2008. Valor alimenticio del pasto kikuyo cv. Whittet en dos estaciones de crecimiento. *Interciencia* 33(002):135-139.
- Allison, C.D. 1985. Factors affecting forage intake by range ruminants: a review. *Journal of Range Management*, 38: 305-311.
- AOAC (Association of Official Agricultural Chemists). 1980. *Methods of analysis*. 13. ed. Washington D.C. EUA. 376-384 p
- AOAC (Association of Official Agricultural Chemists). 1990. *Official methods of analysis*. 15th. ed. Arlington V.A. USA. 1140 p.
- Apraez, E; Crespo, G; Herrera, R. 2007. Efecto de la aplicación de abonos orgánicos y mineral en el comportamiento de una pradera de kikuyo (*Pennisetum clandestinum* Hoehchs) en el Departamento de Nariño, Colombia. *Rev. Cubana de Ciencia Agrícola*, 41: 75-79.
- Arce, J. 2008. *Práctica Dirigida Realizada en la Finca de Ganado Lechero Estabulado "La Georgina" ubicada en Vara Blanca de Heredia*. Tesis Lic. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 64 p.
- Bassi, T. 2006. *Conceptos básicos sobre la calidad de los forrajes*. Cátedra de Manejo de Pasturas. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Lomas de Zamora. Lomas de Zamora, Argentina. 13 p.
- Bernal, J. 1991. *Pastos y forrajes tropicales*. 2. ed. Banco Ganadero. Colombia. p. 491-524.
- Bertsch, F. 1987. *La fertilización de los suelos y su manejo*. Asociación Costarricense de la Ciencia del Suelo. San José, Costa Rica. 157 p.
- Bolaños, R.; Watson, V. 1993. *Mapa ecológico de Costa Rica, según el sistema de clasificación de zonas de vida del mundo de L.R. Holdridge*. Centro Científico Tropical. ICE. San José, Costa Rica. Escala 1:200.000.
- Butris, G.Y; Phillips, CJC. 1987. The effect of herbage surface water and the provision of supplementary forage on the intake and feeding behavior of cattle. *Grass and Forage Science* 42:259-264
- Castillo, E.; Coward, J.; Sánchez, J.M.; Jiménez, C.; López, C. 1983. Efecto de la fertilización nitrogenada en la época lluviosa sobre productividad, composición química y digestibilidad *in vitro* del pasto kikuyo bajo pastoreo en el cantón de coronado. *Agronomía Costarricense* 7:9-15.
- CIA (Centro de Investigaciones Agronómicas, CR)-UCR (Universidad de Costa Rica, CR). 2016. *Mapa digital d Suelos de Costa Rica (vector, escala 1: 200.000, CIA-UCR, IICA, ACCS, INTA, Costa Rica*.
- Correa, H.J.; Pabón, M.L.; Carulla, J.E. 2008. Valor nutricional del pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum* Hoechst Ex Chiov.) para la producción de leche en Colombia (Una revisión): II Contenido de energía, consumo, producción y eficiencia nutricional. *Livestock Research for Rural Development*. On-line Edition, 20 (4), Artículo n. 61.
- Cowan, R.T. and Lowe, K.F. 1998. Tropical and subtropical grass management and quality. En: *Grass for Dairy Cattle*. Ed Cheney J.H. and Cherney D.J.R., pp 101-136. CABI Publishing. Wallingford, Oxon, U.K.
- Dormond, H.; Boschini, C.; Rojas, A.; Zúñiga, A. 1998. Efecto de cuatro niveles de cáscara de banano maduro sobre la degradabilidad ruminal de la materia seca de los pastos Kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) estrella africana (*Cynodon nlem-fluensis*) en vacas Jersey. *Agronomía Costarricense* 22:163-172.

- Gherbin, P.; Franchi, A.S.; De Monteleone, M.; Rivelli, A.R. 2007. Adaptability and productivity of some warm-season pasture species in a Mediterranean environment. *Grass and Forage Science* 62:78-86.
- Gibb, MJ; Treacher, TT. 1984. The performance of weaned lambs offered diets containing different proportions of fresh perennial ryegrass and white clover. *Animal Production* 39:413-420.
- Haydock, K; Shaw, N. 1975. The comparative yield method for estimating dry matter yield of pasture. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry* 15:663-670.
- Holland C., Kezar W. 1995. The Pioneer forage manual. A nutritional guide.
- IMN (Instituto Meteorológico Nacional, CR) 2008. Resumen Meteorológico. Boletín Mensual. San José, Costa Rica. P 30-32.
- Laredo, M; Cuesta, P. 1988. Tabla de contenido nutricional en pastos y forrajes de Colombia. Instituto Colombiano Agropecuario. Programa de Nutrición Animal. Santafé de Bogotá, Colombia. 77 p.
- Machado, D.; Dávila, C.1998. Efectos de la fertilización con N, P y K y el microclima, en la asociación de alfalfa (*Medicago sativa*) y kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) bajo pastoreo rotativo. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia* 15:38-58.
- Mesén, M.; Sánchez, W. 2006. Evaluación de gramíneas forrajes en la zona alta lechera de Costa Rica. *Alcances Tecnológicos* 4:29-35.
- Mojica, J.E.; Castro, E.; León, J.M.; Cárdenas, E.A.; Pabón, M.L.; Carulla, J.E. 2009. Efecto de la oferta de pasto kikuyo y ensilado de avena sobre la producción y calidad composicional de la leche bovina. *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 10:81-90.
- Neal, J.S.; Fulkerson, W.J.; Lawrie, R.; Barchia, I.M. 2009. Difference in yield and persistence among perennial forages used by the dairy industry under optimum and deficit irrigation. *Crop and Pasture Science* 60:1071-1087.
- NRC. 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7. ed. rev. National Research Council. p. 13-17.
- Osoro, K; Cebrian, M. 1989. Digestibility of energy and gross energy intake in fresh pastures. *Grass and Forage Science* 44:41-46.
- Peters, K. 2008. Valor nutricional y disponibilidad de biomasa del pasto kikuyo (*Kikuyuochloa clandestina* Hoscht. Ex Chiov.) en sistemas de pastoreo basados en la edad fenológica de la planta. Tesis Lic. Universidad de Costa Rica. 125 p.
- Quiroga, D; Barreto, A. 2002. Respuesta en rendimientos y calidad de una pradera de kikuyo degradada a tratamientos de mecanización y aplicación de compost en la sabana de Bogotá. Tesis de licenciatura en Zootecnista. Bogotá, Colombia. Universidad Nacional de Colombia, 77 p.
- Sáenz, A. 1970. Historia agrícola de Costa Rica. Universidad de Costa Rica. Serie Agronomía No. 12. San José. 237-343 p.
- Sánchez, JM. 2007. Utilización eficiente de las pasturas tropicales en la alimentación del ganado lechero. *In Seminario de Pastos y Forrajes en Sistemas de Producción Animal* (11, 2007, Barquisimeto, Venezuela). 25 p.
- Sánchez, J.M.; Soto, H. 1999. Niveles de energía estimada en los forrajes de un distrito de mediana producción lechera, Fortuna de San Carlos en la Zona Norte de Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 23:179-185.
- Sánchez, J.M.; Coward, J.; Jiménez, C.; Sossa, R.; López, C. 1985. Efecto de la fertilización nitrogenada en la época seca sobre producción y valor nutritivo del pasto kikuyo bajo pastoreo en el cantón de Coronado. *Agronomía Costarricense* 9:219-227.
- Sánchez, W.; Hidalgo, C.; Mesén, M. 2014. Adaptación de variedades de ryegrass y kikuyo en la zona alta lechera de Cartago. *Alcances Tecnológicos* 10:13-20.
- Sánchez, W.; Mesén, M. 2010. Establecimiento y manejo del pasto kikuyo (*Kikuyuochloa clandestina*). *Alcances Tecnológicos* 8:71-80.
- SAS (Statistical Analysis System, USA). 2002. Software version 9.0. SAS Institute. Inc., Cary, NC, USA.

Soto, C.; Valencia, A.; Galvis, R.D.; Correa, E.J. 2005. Efecto de la edad de corte y del nivel de fertilización nitrogenada sobre el valor energético y proteico del pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*). Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias 18:17-26.

Toledo, JM; Schultze-Kraft, R. 1982. Metodología para la evaluación agronómica de pastos tropicales. In Manual para la Evaluación Agronómica. Toledo, JM (ed.). Red Internacional de Evaluación de Pastos Tropicales (RIEPT), CIAT, Colombia. p. 91-109.

Van Soest, PJ; Robertson JB. 1979. Forage fiber analysis. Agr. Handbook. No. 379. USDA. Washington, D.C. EUA.60 p.

Van Soest, PJ. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. Journal of Dairy Science, 74: 3583-3597.

Van Soest, PJ. 1992. Nutritional ecology of the ruminant. Ithaca, NY, EUA. Comstock-Cornell University Press. 122 p.

Vélez, L. 1987. Cambios circadianos en carbohidratos no estructurales y solubles de gramíneas y leguminosas en la sabana de Bogotá. Tesis de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. 86 p.

Villalobos, L.; Arce, J.; Wing Ching, R. 2013. Producción de biomasa y costos de producción de pastos estrella africana (*Cynodon nlemfuensis*), kikuyo (*Kikuyuochloa clandestina*) y ryegrass perenne (*Lolium perenne*) en lecherías de Costa Rica. Agronomía Costarricense 37:91-103.

Zapata, F. 2000. Kikuyo. Especies Forrajeras Versión 1.0. Colombia. 18 p.

DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DE *TUTA ABSOLUTA* Y *KEIFERIA* SPP. EN EL CULTIVO DE TOMATE (*SOLANUM LYCOPERSICUM*) EN COSTA RICA

Yannery Gómez-Bonilla, Cristina Vargas-Chacón¹

RESUMEN

Distribución espacial de *Tuta absoluta* y *Keiferia* spp. en el cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*) en Costa Rica. El taladrador del fruto del tomate, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) es una plaga que ha invadido muchos países alrededor del mundo, y ha causado pérdidas considerables a los tomates, lo que afecta la seguridad alimentaria y los medios de vida de millones de productores y consumidores que dependen de la actividad. Hasta el año 2014 no se había reportado esta plaga en el país. El presente estudio se realizó durante los años 2014 al 2016 y tuvo como objetivo investigar la presencia y distribución geográfica de *Tuta absoluta* y *Keiferia* sp. En este trabajo se visitaron fincas sembradas con tomate en diferentes zonas agroecológicas de Costa Rica, donde se recolectaron muestras de frutos y hojas minadas y se colocaron trampas con feromonas, para la captura de adultos. En todos los sitios muestreados se observó daños ocasionados por la plaga *T. absoluta* tanto en el fruto como en el follaje. Los daños al cultivo fueron la perforación del fruto inmaduro, el follaje con más dañado tenía un aspecto similar a una quema, pero al acercarse se observaron las múltiples minas en las hojas. Los adultos capturados fueron llevados al laboratorio para confirmar la identificación del insecto mediante la caracterización morfológica de la genitalia. La plaga *Tuta absoluta*, estuvo presente todos sitios muestreados a lo largo del país. Los agricultores reportaron pérdidas mayores al 50%. No se encontró la especie *Keiferia lycopersicella* (Wals), pero se recolectaron dos especies de *Keiferia*, que fueron enviadas a especialista para su identificación.

Palabras clave: Genitalia, Minador del tomate, Plaga invasiva, Trampas con feromona.

Keywords: Genitalia, Tomato miner, Invasive pests, Pheromone trap.

INTRODUCCIÓN

El cultivo del tomate es la hortaliza de mayor producción mundial (SEPSA 2010), El fruto del tomate tiene varias plagas y enfermedades que lo afectan ocasionando grandes pérdidas económicas, entre ellas están los perforadores del fruto: *Keiferia lycopersicella* (Gelechiidae), *Tuta absoluta* (Gelechiidae), *Neoleucinodes elegantalis* (Pyralidae) del orden Lepidoptera.

Keiferia lycopersicella (Wals), causa daño en el follaje y frutos, las larvas inicialmente atacan las hojas, pero luego continua con las frutas o tallos a medida que crecen. La identificación de las especies requiere ser examinado por un especialista. El minador del tomate, *Tuta absoluta* (Meyrick), es una plaga importante del tomate fresco, perjudica tanto en invernadero como en campo abierto.

¹ Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria, INTA. Costa Rica. Yangomez27@yahoo.com, cvargas@inta.go.cr. Sede del Laboratorio de Fitoprotección del INTA. Sabana Sur, San José.

El huésped preferido de *T. absoluta* es tomate, *Solanum lycopersicum* L., pero también se ha registrado en otros cultivos como la papa (*Solanum tuberosum* L.), berenjena (*Solanum melongena* L.), el tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), pepino dulce (*Solanum muricatum* Aiton), uchuva (*Physalis peruviana* L.) y en las plantas silvestres, tales como *Solanum nigrum* L., *Datura stramonium* L., *Lycium chinense* Mill., y *Malva* sp. (Pereyra y Sánchez 2006; EPPO 2009; Tropea Garzia 2009; Desneux *et al.* 2010).

Tuta absoluta ataca a las hojas, flores, tallos y sobre todo en las frutas en cualquier etapa de desarrollo, desde plántulas hasta plantas maduras. En ausencia de estrategias de manejo, el daño en la fruta puede alcanzar el 100%. Los daños en la hoja son causados cuando las larvas se alimentan del mesófilo, se da expansión de las minas que afectan la capacidad fotosintética del cultivo, lo que reduce el rendimiento según indica Urbaneja y colaboradores (2012).

En mayo del año 2014, Costa Rica reportó oficialmente la presencia de la plaga cuarentenaria *Tuta absoluta* en el país (IPPC 2015). La especie *Tuta absoluta* (Meyrick), es considerada una plaga mucho más agresiva que *K. lycopersicella* considerada devastadora (Ramos y Juárez 2011). Muchos países ya han reportado esa plaga como devastadora uno de los últimos Nigeria (Aigbedion-Atalor *et al.* 2019), citan la plaga por primera vez, Perevertin *et al.* (2020) indican que en el año 2006 se da la invasión transatlántica de *T. absoluta* al viejo mundo proveniente de Suramérica.

Para el año 2014, los agricultores costarricenses reportaron tener problemas con el barrenador del fruto del tomate, que les estaba perforando el fruto de una manera más agresiva, por tal razón se comunicaron al Laboratorio de Fitoprotección (INTA) y enviaron muestras con el problema. Por lo tanto, el presente estudio a nivel nacional se llevó a cabo para investigar la presencia y distribución geográfica de *Tuta absoluta* y *Keiferia* sp.

MATERIALES Y MÉTODOS

Distribución espacial

Se realizó un recorrido por plantaciones de tomate, cada semana, donde se tomaron muestras de frutos perforados colocados en bolsas plásticas y hojas minadas, las que se transportaron en papel toalla, todo identificado por finca para ser llevadas al laboratorio, ahí el material se introdujo en jaulas individuales, para desarrollo hasta adulto de las diferentes fases del insecto. Estas visitas fueron coordinadas en conjunto con el Servicio Fitosanitario del Estado (SFE) y se aprovechó para instalar dos trampas en el campo, una para cada género de los minadores *Tuta absoluta* y *Keiferia* sp., se visitaron dos plantaciones en la principales zonas productoras de tomate en todo el país, las mismas fueron escogida al azar, por lo tanto se encontraron fincas en diferentes alturas y edades del cultivo, diferentes

manejos agrícolas y variedades de tomate. Las trampas se mantuvieron durante un mes en cada finca; las colectas se realizaron en varios meses del año 2014 al 2016. Cada semana se recolectaron adultos con ayuda de un colador plástico y se cambiaba el agua con jabón de cada trampa (figura 1). Las trampas se colocaron a 30 cm del suelo y la distancia mínima entre trampas fue de 50 m, se colocó una trampa de cada género para efectos de monitoreo. Las feromonas que se utilizaron fueron adquiridas en la empresa Chemtica Internacional S.A. Los insectos adultos capturados fueron colocados en frascos con alcohol de 70° y fueron registrados por cada una de las fincas y se llevaron al laboratorio de Fitoprotección del INTA, donde se realizó la identificación de los géneros de insectos mediante la clave de la genitalia.



Figura 1. Trampa acuosa con atrayente a base de feromona utilizada en las fincas sembradas con el cultivo de tomate. INTA, 2014.

Identificación morfológica

Las características internas y externas de los individuos se examinaron en el laboratorio, para esto los insectos fueron secados en una toalla limpia y se codificaron con las siglas MLPT (microlepidóptero) y un número consecutivo, para luego proceder a la identificación del insecto siguiendo el procedimiento LF-P-20 “Montaje de genitalia de microlepidópteros”, en el cual, el abdomen se separó del resto del cuerpo y se clarificó con una solución de hidróxido de potasio al 8% por 24 horas. Seguidamente se pasó a alcohol de 30 y 70% y con ayuda de un pincel se eliminaron las escamas (Fiaboe, *et al.* 2020). Posteriormente, se tiñó la genitalia con dos colorantes de contraste (clorazol y eosina al 1%), que permitió extraer la genitalia del abdomen. Luego, se realizó una comparación al estereoscopio, de las estructuras con las disponibles y específicas para la

clasificación respectiva, como la llave taxonómica inglesa para lepidópteros,

Disponibles en:

- <http://britishlepidoptera.weebly.com/key-to-male-genitalia-gelechiidae.html>
- <http://mothphotographersgroup.msstate.edu/genitalia.php?hodges=2047>
- <http://idtools.org/id/leps/micro/factsheet.php?name=%3Cem%3EKeiferia+lycopersicella%3C%2Fem%3E>

En cuanto a las genitalias, unas se colocaron dentro de viales de 2 ml con glicerina y otras se montaron en láminas fijas en euparal para su almacenaje. Algunos adultos se colocaron intactos dentro de cápsulas de gel.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificar la especie de mayor incidencia que causa el daño en el fruto

En las fincas visitadas se constató el daño al cultivo que estaban reportando los productores. Al caminar y mover el follaje se observaron polillas (figura 2) con una longitud menor a 1 cm, de color café claro o gris claro con un patrón alar con manchas más oscuras.



Figura 2. Polillas presentes en las plantaciones de tomate. Costa Rica. 2014.

En algunas hojas se observaron larvas dentro del tejido, las cuales formaban minas gruesas e incluso áreas grandes sin mesófilo. En los frutos se observaron pequeñas perforaciones, estas fueron mas abundantes en el área del peciolo. En fincas donde el daño por el insecto fue mayor se observaron larvas y sus restos fecales alrededor del peciolo (figura 3).



Figura 3. A. Daño al follaje semejante a una quema por sol B. Minas y áreas mayores de mesófilo afectadas en hojas C. Presencia de larvas y sus restos fecales E. Daños a nivel de peciolo. Santa Ana, San José. 2014-2016.

La identificación de los adultos recolectados se realizó por medio de la genitalia del insecto, la cual luego de preparada se observó bajo la luz en un estereoscopio. Las estructuras se compararon con las llaves taxonómicas referidas con lo que se logró identificar la presencia de *Tuta absoluta* y *Keiferia* sp. En la genitalia del macho de *T. absoluta* (figura 4A) se observó un uncus (a) acampañado y más ensanchado hacia la base, sus valvas (b) poseen un margen interno convexo con setas evidentes en su parte apical y con una espina

sobresaliente en su cara interna, el tegumen (c) se ensancha en la porción basal. Se observó un gnatos (d) esclerotizado, ancho y redondeado en el ápice, el vinculum (e) se observó ancho y bien desarrollado con un saccus (f) igualmente ancho y alargado y el aedeago también se observó bien esclerotizado, con un ciego evidente en forma de gancho. En la genitalia de la hembra de *T. absoluta* (figura 4B), se observó las apófisis anteriores y posteriores bastante cercanas, y se observó el signun en la parte superior de la bursa copulatrix.

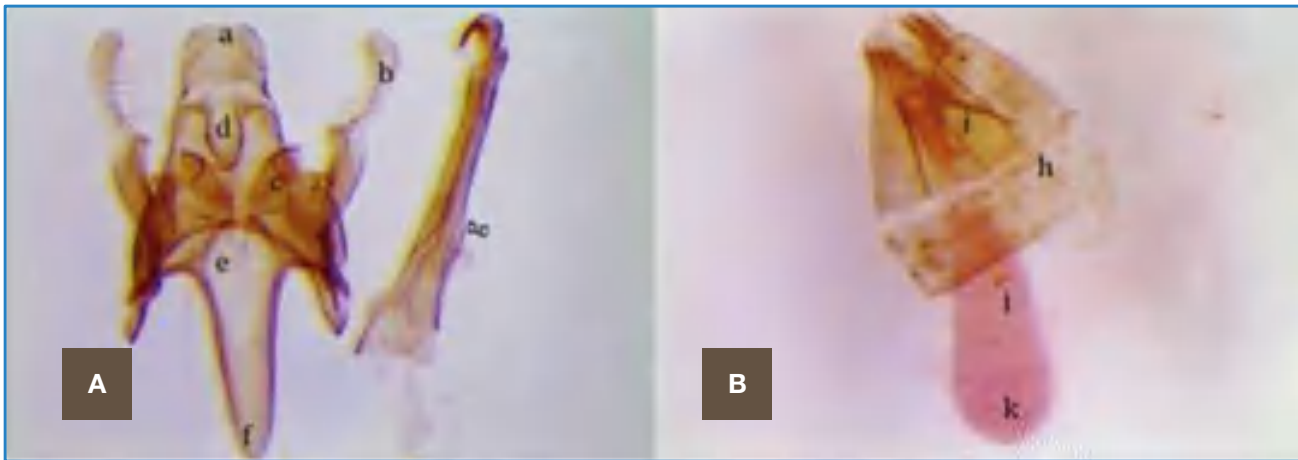


Figura 4. A. Genitalia del macho B. Genitalia de la hembra (B) de *Tuta absoluta* (a) uncus, (b) valvas, (c) tegumen, (d) gnatos, (e) vinculum, (f) sacus, (g) aedeago, (h) hipófisis anteriores, (i) hipófisis posteriores, (j) sigmum, (k) bursa colupatriz. INTA. 2014.

Las especies de *Keiferia* asociadas al cultivo del tomate, no pudieron ser identificadas a nivel de especie por expertos nacionales ni extranjeros, por lo cual se clasificaron como nuevas especies no reportadas y se les ha designado por el momento como *Keiferia* (nov sp.) tipo 1 y *Keiferia* (nov sp.) tipo 2 y son descritas a continuación.

Los adultos de estas “nuevas especies”, son muy parecidas a la especie de *Keiferia lycopersicella*, por lo que sus características morfológicas externas no ayudan suficiente para diferenciarlas. Estos microlepidópteros poseen una longitud aproximada de 5 a 7 mm y en la parte caudal del macho se observa una porción distal del uncus en forma de hoz o gancho levemente curvado, cuya forma es característica de la especie (figura 5).



Figura 5. Porción caudal de *Keiferia* spp., en la cual se observa la porción distal del uncus. INTA. 2015.

La diferenciación entre especies se realizó mediante la disección y preparación de la genitalia y posteriormente su observación en un estereoscopio. En la Figura 6, se observa el detalle de la genitalia de un macho de la especie *Keiferia* (nov sp.) tipo 1, como se mencionó la forma de los uncus es característica de la especie, sin embargo, se observaron diferencias claras en relación con *Keiferia lycopersicella* (figura 7) a nivel de uncus, valvas, vinculum, saccus y aedeago.

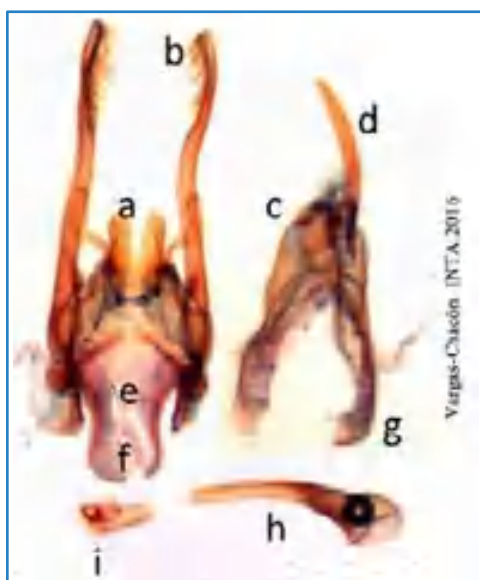


Figura 6. Genitalia de un macho de *Keiferia* (nov sp.) tipo 1. (a) uncus, (b) valvas, (c) tegumen, (d) gnatos, (e) vinculum, (f) saccus, (g) pedúnculo (h) aedeago, (i) extremo apical. INTA, 2016.

Las valvas de la especie *Keiferia* (nov sp.) tipo 1, son alargadas se ensanchan hacia el final y no se observan digitadas como las de *T. absoluta* y *Keiferia lycopersicella* y poseen una leve curvatura hacia la línea media. La porción apical, como se indicó es más engrosada y posee cerdas. A diferencia de las valvas de *K. lycopersicella* estas son más uniformes sin bifurcaciones.

En esta “nueva especie” se observó en el vinculum la presencia de dos procesos en forma de cuernos a los lados y un proceso ancho que termina en punta en su línea media, muy diferente al de *K. lycopersicella* cuyo vinculum presenta tres procesos digitiformes.

El saccus de esta especie encontrada es mucho más corto y ensachado en la base que el de *K. lycopersicella*. En cuanto al aedeago es mas grueso que el de *K. lycopersicella* con una porción basal y apical globosa.



Figura 7. Genitalia de un macho de *Keiferia lycopersicella*.

Fuente: www.idtools.org

En la Figura 8 se observa una genitalia de un macho de *Keiferia* (nov sp) tipo 2. Esta segunda especie es muy diferente al tipo 1 y a *K. lycopersicella*. Se observó diferencias fundamentalmente a nivel de uncus, valvas, vinculum, saccus y aedeago.

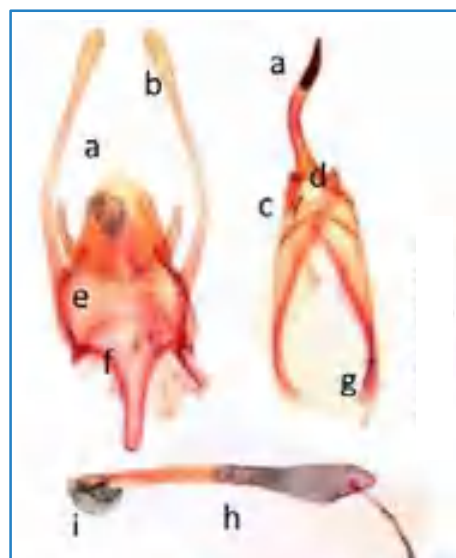


Figura 8. Genitalia de un macho de *Keiferia* (nov sp.) tipo 2. (a) uncus, (b) valvas, (c) tegumen, (d) gnatos, (e) vinculum, (f) saccus, (g) pedúnculo, (h) aedeago, (i) extremo apical. INTA, 2016.

En esta especie presenta un uncus en forma de hoz que es característico de la especie. Las valvas son largas, paralelas entre sí, tiene extremos apicales aplanados y con cerdas más abundantes y largas, en comparación con la “nueva especie” tipo 1. No se observaron bifurcaciones en las valvas, como las presentes en *K. lycopersicella*. Una diferencia muy marcada de esta especie “tipo 2” y las otras keiferias mencionadas, se observó en el sacus el cual es bastante corto, ancho y redondeado.

Otra gran diferencia se observó en los procesos del vinculum los cuales se presentaron largos e irregulares (figura 9), observándose en medio de éstos, a nivel del uncus otra estructura bifurcada, semitubular muy diferente a la de la *Keiferia* (nov sp.) tipo 1. El aedeago, se observó con un extremo apical redondeado y el otro extremo robusto y globoso.

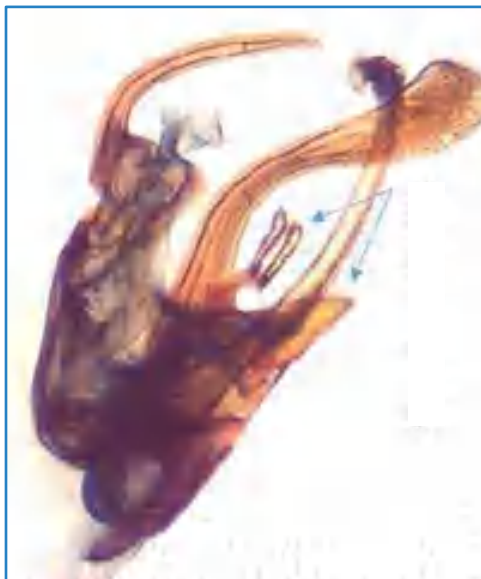


Figura 9. Vista lateral de la genitalia de *Keiferia* (nov. sp.) tipo 2, señalando los procesos del vinculum. INTA. 2016.

Debido a que la captura de los adultos se realizó mediante el empleo de trampas a base de feromonas, la mayoría de los insectos fueron machos. Aún así en las trampas se capturaron algunas hembras de *T. absoluta* cuya genitalia se observa en la Figura 4B. Algunas de las hembras de microlepidópteros capturadas, no presentaron una genitalia con las características morfológicas de *T. absoluta*, por lo que posiblemente sean de alguna de las dos especies de *Keiferia* descritas en este estudio.

En la Figura 10, se muestra la genitalia de una polilla hembra capturada en el cantón de Grecia que no corresponde a la genitalia de una hembra de *Tuta absoluta*, por lo que probablemente sea género *Keiferia* sp. En la genitalia de esta hembra

se observó que la porción anal es alargada, con las apófisis posteriores y anteriores separadas y posee una bursa copulatrix alargada con un sigmum cimentado en una membrana externa muy delgada y con forma de estilete.

Como dato importante, en el punto de captura solamente se identificó la especie *Keiferia* (nov. sp.) tipo 1, por ello existe una posibilidad mayor de que sea una hembra de esta especie. Hay que considerar que para establecer con certeza que esta genitalia corresponde a alguna de las dos “nuevas especies” encontradas, es necesario hacer una recolecta de los especímenes vivos y establecer su crianza en cautiverio para analizar la correspondencia de la hembra con su respectivo macho.



Figura 10. Genitalia de una posible hembra de *Keiferia* (nov. sp) tipo 1. A. Genitalia completa. B vista ampliada del signum en la bursa copulatrix. INTA 2016.

Con los insectos capturados e identificados se estableció una colección de las especies recolectadas, a fin de preservar las genitalias en un medio de glicerina y se realizaron algunos montajes permanentes. Además, se guardaron adultos completos en cápsulas de porcelana. Tanto los adultos como las genitalias disectadas se encuentran disponibles en las colecciones de referencia con que cuenta el Laboratorio de Fitoprotección del INTA.

Distribución espacial de *T. absoluta* y *Keiferia* sp. en el país

Se determinó en este estudio, que el microlepidóptero *T. absoluta* estuvo presente en todas las localidades muestreadas del país, desde la zona sur, en la localidad de Sabalito-Coto Brus, San Isidro del General, Región Central Oriental (Cartago y Santa Ana) Central Occidental (Heredia, Grecia y Zarcero), hasta llegar a la Región Norte en la zona de Guanacaste (Nicoya y Santa Cruz) (figura 10). El 95% de los insectos recolectados en estas fincas correspondió a la plaga *Tuta absoluta* y solamente un 5% a las especies de *Keiferia* sp. Este hallazgo demuestra la capacidad de *Tuta absoluta* de propagarse rápidamente por el país. Al respecto, Guimapi *et al.* (2016) y Cherif *et al.* (2019) indican que la plaga tiene una buena capacidad de dispersarse cuando las condiciones ambientales son favorables (Santana *et al.* 2019).

Se presentó una excepción en Cerro Verde de Nicoya, en la provincia de Guanacaste, donde solo un 59% de los insectos capturados correspondió a *Tuta absoluta* y el 49% restante correspondió a *Keiferia* (nov.sp) tipo 2.

Todos los agricultores entrevistados mencionaron que la presencia de *Tuta absoluta* en sus plantaciones, les está ocasionando pérdidas de hasta el 50% en la producción. Estos insectos tienen la característica que se han adaptan fácilmente a las zonas recién invadidas por lo que se convierten en plagas de importancia económica y posiblemente pueden causar el desplazamiento de especies nativas (Asplen *et al.* 2015; Desneux *et al.* 2011; Pimentel *et al.* 2005).

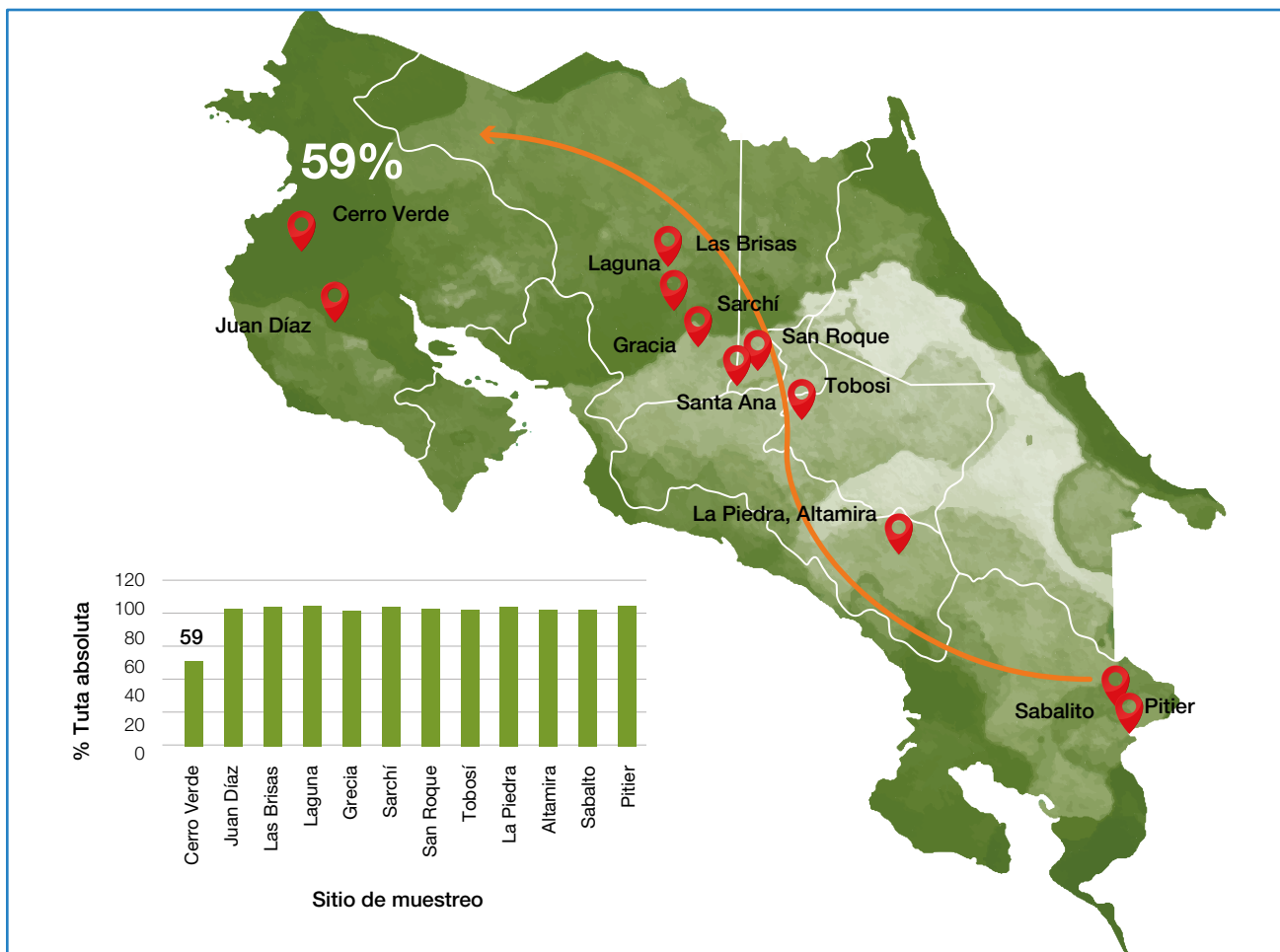


Figura 11. Distribución de *Tuta absoluta* en el territorio nacional. Costa Rica. 2016.

Fuente: Google earth modificado por el autor.

Estos resultados coinciden con los resultados por Mora (2016), quien menciona que algunos adultos encontrados en las trampas con atrayente para *K. lycopersicella* correspondieron a *T. absoluta* y no se encontraron individuos de *K. lycopersicella*.

La especie *Keiferia lycopersicella* fue reportada desde hace 30 años en Costa Rica; sin embargo, en este estudio, no se encontró ningún espécimen que coincidiera con la genitalia descrita para este insecto. Se desconoce que sucedió con la especie *Keiferia lycopersicella*, aunque su ausencia en los sitios muestreados del país podría deberse a que pudo ser desplazada por otros insectos o bien, que fue mal identificada. Según el Bulletin EPPO, (2013), la especie *Keiferia lycopersicella* (Walsingham) ha sido objeto

confusión taxonómica desde que se recolectaron los primeros especímenes a partir de tomates en California en el año 1923.

De las dos especies de *Keiferia* encontradas, la especie *Keiferia* (nov sp.) tipo 1 estuvo presente mayoritariamente en la zona sur y central del país. En la provincia de Guanacaste no se identificó ningún espécimen que perteneciera a este tipo. La especie *Keiferia* (nov sp.) tipo 2 se encontró a lo largo de todo el país (Figuras 12 y 13).

En los muestreos realizados en invernaderos en el cantón de Zarcero (Laguna y las Brisas), se identificó la presencia de la especie *T. absoluta* y no se observó ningún espécimen de la especie *Keiferia* spp (figura 12).

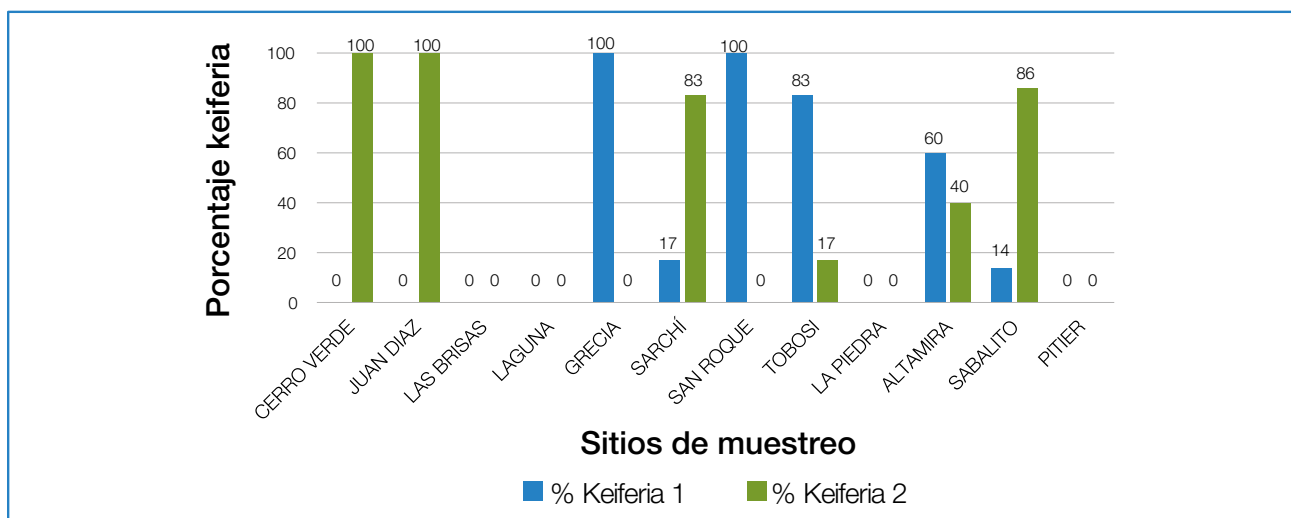


Figura 12. Porcentaje de *Keiferia* (nov sp.) tipo 1 y *Keiferia* (nov sp.) tipo 2 del total, de keiferias capturadas en fincas sembradas con tomate. Costa Rica. Período 2014-2016.

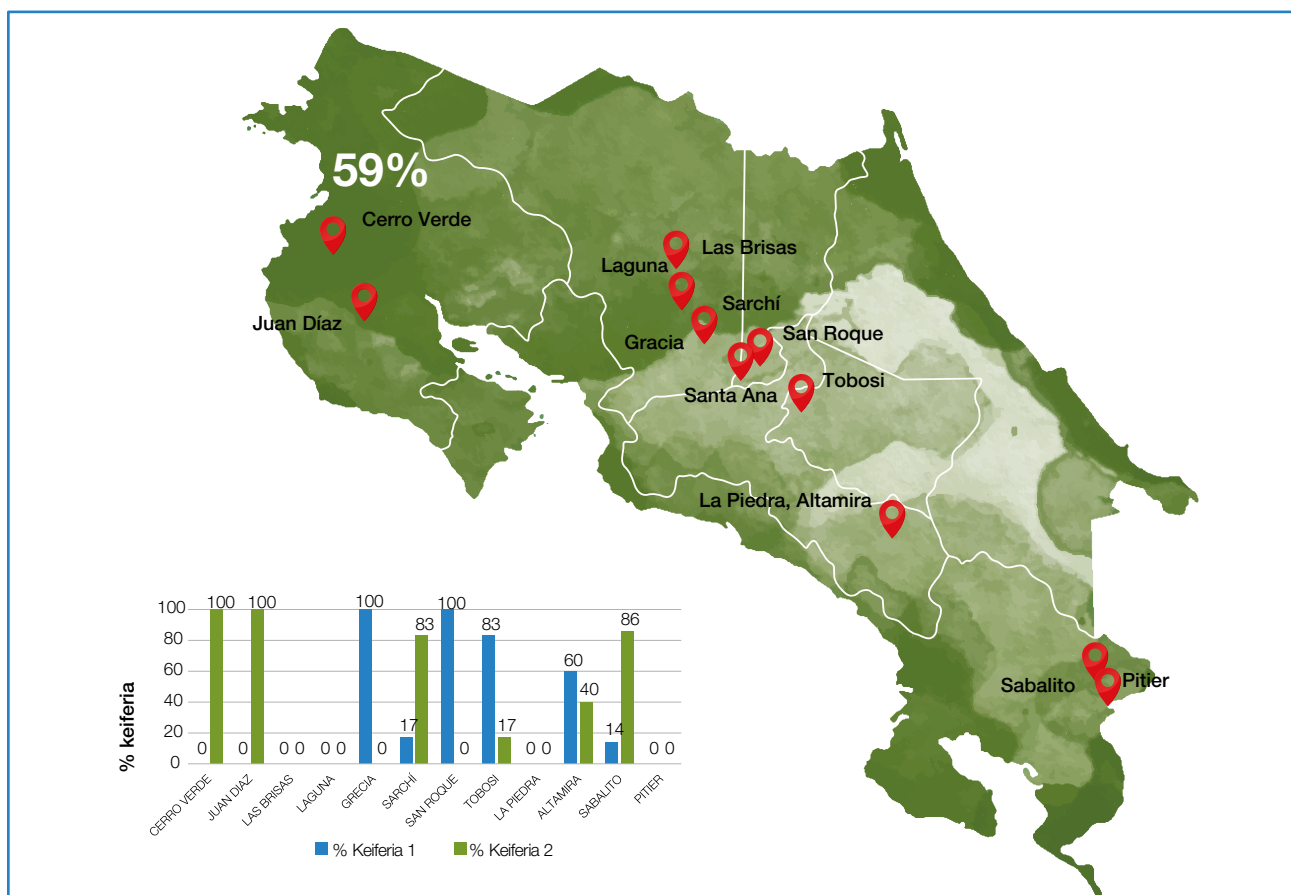


Figura 13. Distribución de *Keiferia* sp. en Costa Rica. Período 2014-2016.

Fuente: Google eart, modificada por el autor.

Deben realizarse más investigaciones para evaluar el impacto económico de las polillas, seguidas del desarrollo de un plan de manejo agroecológico con medidas sostenibles y adecuadas para cada región muestreada.

CONCLUSIONES

La plaga *Tuta absoluta* se encuentra distribuida a lo largo de todo el territorio nacional desde el año 2014.

Dos nuevas especies de *Keiferias* diferentes a *Keiferia lycopersicella*, se encuentran en el territorio nacional.

LITERATURA CITADA

- Aigbedion-Atalor, P; Oke, A; Oladigbolu, A; Layade, A; Igbinosa, B; Mohamed, S. 2019. *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) invasion in Nigeria: first report of its distribution Journal of Plant Diseases and Protection. 126: 603-606.
- Asplen, M; Anfora, G; Biondi, A; Choi, D; Chu, D; Daane, K; Gibert, P; Gutierrez, A; Hoelmer, K; Hutchison, W; Isaacs, R; Jiang, L; Kárpáti, Z; Kimura, M; Pascual, M; Phillips, C; Plantamp, C; Ponti, L; Véték, G; Vogt, H; Walton, V; Yu, Y; Zappala, L; Desneux, N. 2015. Invasion biology of spotted wing Drosophila (*Drosophila Suzuki*): A global perspective and future priorities. Journal of Pest Science 88(3):469-494.
- EPPO. 2013. EPPO data sheets on pests recommended for regulation Fiches informatives sur les organismes recommandés pour réglementation *Keiferia lycopersicella* (en línea). Eppo Bulletin 43(1):141-143. Consultado el 19 set 2014. Disponible en <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/epp.12026>
- Cherif, A; Attia-Barhoumi, S; Mansour, R; Zappalà, L; Grissa-Lebdi, K. 2019. Elucidating key biological parameters of *Tuta absoluta* on different host plants and under various temperature and relative humidity regimes (en línea). Entomologia Generalis 39:1-7. Consultado el 15 mar 2020. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/333635754_Elucidating_key_biological_parameters_of_Tuta_absoluta_on_different_host_plants_and_under_various_temperature_and_relative_humidity_regimes
- Desneux, N; Wajnberg, E; Wyckhuys, K; Burgio, G; Arpaia, S; Narváez-Vasquez, C; González-Cabrera, J; Ruescas, D; Tabone, E; Frandon, J; Pizzol, J; Poncet, C; Cabello, T; Urbaneja, A. 2010. Biological invasion of European tomato crops by *Tuta absoluta*: ecology, geographic expansion and prospect for biological control. Journal of Pest Science. (en línea). 83:197-215. Consultado el 19 set 2014. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/225082799_Biological_invasion_of_European_tomato_crops_by_Tuta_absoluta_Ecology_geographic_expansion_and_prospects_for_biological_control
- Desneux, N; Luna, MG; Guillemaud, T; Urbaneja, A. 2011. The invasive south American tomato pinworm, *Tuta absoluta*, continues to spread in Afro-Eurasia and beyond: The new threat to tomato world production. Journal of Pest Science. 84(4):403-408.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2009. *Tuta absoluta* found on *Phaseolus vulgaris* in Sicilia (IT). EPPO Reporting Service 8:3 (en línea) Francia. Consultado el 9 set 2014. Disponible en <https://gd.eppo.int/reporting/article-342>.
- EPPO. 2013. *Keiferia lycopersicella* (Lepidoptera: Gelechiidae). Tomato pinworm (en línea). Francia. Consultado 19 set 2014. Disponible en http://www.eppo.int/QUARANTINE/Alert_List/insects/keiferia_lycopersicella.htm.
- Guimapi, R; Mohamed, S; Okeyo, G; Ndjomatchoua, F; Ekesi, S; Tonnang, H. 2016. Modeling the risk of invasion and spread of *Tuta absoluta* in Africa. Ecological Complexity 28:77-93.
- Pereyra, P; Sánchez, N. 2006. Effect of two Solanaceous plants on developmental and population parameters of the tomato leaf miner, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Neotropical Entomology 35:71-676.

Pimentel, D; Zúñiga, R; Morrison, D. 2005. Update on the environmental and economic costs associated with alien invasive species in the United States. *Ecological Economics* 52(3):273–288.

Ramos, C; Juarez, M. 2011. Protocolo de identificación de la polilla del tomate (*Tuta absoluta* Meyrick) Lepidóptera: Gelechiidae. OIRSA (Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria). El Salvador. 9 p.

Fiaboe, K; Agboka, K; Agboyi, L; Koffi, D; Ofoe, R; Kpadonou, G; Agnamba, A; Assogba, K; Adjevi, M; Zanou, K; Fenning, O. 2020. First report and distribution of the South American tomato pinworm, *Tuta absoluta* (Meyrick) Lepidoptera: Gelechiidae) in Togo. *Phytoparasitica* 49:167-177.

Santana, P; Kumar, L; Da Silva, R. 2019. Global geographic distribution of *Tuta absoluta* as affected by climate change. *Journal of Pest Science*. 92(4):1-13.

SEPSA (Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria). 2010. Síntesis analítica, situación y tendencias del sector agropecuario 2004-2008. San José, Costa Rica. 131 p.

Tropea-Garzia, G. 2009. *Physalis peruviana* L. (Solanaceae), a host plant of *Tuta absoluta* in Italy. *IOBC/WPRS Bulletin*. Francia. 49:231–232.

Urbaneja, A; Gonzáles-Cabrera, J; Arnób, A; Gabarrab, R. 2012. Prospects for the biological control of *Tuta absoluta* in tomatoes of the mediterranean basin. *Pest management science* 68:1215-1222.

EFECTO DE LA ÉPOCA CLIMÁTICA EN LA EMISIÓN DE N₂O DE UN SUELO TROPICAL BAJO PASTOREO

Johnny Montenegro-Ballester¹, Eduardo Barrantes-Guevara², Sylvia Ivankovich-Cruz³

RESUMEN

Efecto de la época climática en la emisión de N₂O de un suelo tropical bajo pastoreo. La aplicación de fertilizantes nitrogenados incrementa la emisión del N₂O, lo cual también parece estar influenciada por las condiciones de clima, sin embargo, esta información es muy escasa en el trópico. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de diferentes épocas climáticas en la emisión de óxido nitroso proveniente del suelo cubierto por una mezcla de gramíneas bajo pastoreo. Esta investigación se realizó en un sistema de producción de leche ubicado en Cartago, Costa Rica. Las evaluaciones se efectuaron durante cuatro diferentes condiciones climáticas: 1. época seca, 2. transición de época seca a la lluviosa, 3. época lluviosa y 4. transición de época lluviosa a la seca. En un aparcadero se caracterizó la mezcla de gramíneas pastoreada y su manejo. Con cámaras estáticas colocadas aleatoriamente, se recolectaron muestras gaseosas, también se recolectaron muestras de suelo para determinar la humedad. La emisión de N₂O-N fue menor (P<0,001) durante la época seca y en la transición a la lluviosa. Las mayores emisiones (P<0,001) se presentaron durante la época lluviosa y el nivel de humedad del suelo influyó en ella. La emisión anual estimada fue de 2,40±0,21 kg de N₂O-N ha⁻¹ año⁻¹, lo cual representa 0,42% del nitrógeno aplicado. Este valor es inferior al sugerido por el Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) para estimar las emisiones de óxido nitroso. Se demostró la importancia de considerar en el trópico las épocas climáticas en el desarrollo de factores de emisión nacional.

Palabras clave: Gases con efecto invernadero, ganado de leche, cambio climático, mitigación, factor de emisión.

ABSTRACT

Nitrogen fertilization increases the emission potential of N₂O, which could be influenced by climatic conditions. However, this information is very scarce in the tropics. The objective of this research was to determine the effect of different climatic seasons in the emission of nitrous oxide coming from a soil covered by a mixture of grasses under grazing. This research was established in a specialized milk production system in Cartago, Costa Rica. The evaluations were carried out in four different climatic seasons: 1. dry season, 2. transition from dry to rainy season, 3. rainy season, and 4. transition from rainy to dry season. A paddock was selected, and the mixture of grass and its management was characterized. Using static chambers placed randomly in

1 Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA) - Instituto Meteorológico Nacional (IMN), Barrio Aranjuez, San José, Costa Rica. jmontenegro@inta.go.cr, jmontenegro@imn.ac.cr (<https://orcid.org/0000-0001-8526-570X>).

2 Universidad Técnica Nacional, Dirección de Investigación y Transferencia, Sede Atenas ebarrantes@utn.ac.cr (<https://orcid.org/0000-0002-0383-3388>).

3 Lechera Ucrania, Gerente propietaria, Cartago, Costa Rica, sivankovich@masey.com (<https://orcid.org/0000-0001-6381-4595>).

the paddock, gaseous samples were collected. The emission of N₂O-N was lower ($P < 0.001$) during summer season, and the transition to the rainy season. The highest emissions ($P < 0.001$) occurred during the rainy season, when was demonstrated the influenced of soil moisture in the emission. The estimated annual emission was 2.40 ± 0.21 kg of N₂O-N ha⁻¹ year⁻¹, which represents 0.54% of the applied nitrogen. This value is lower than that suggested by the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) to estimate nitrous oxide emissions. The importance of considering the climatic conditions in the tropic when developing national emission factors was demonstrates.

Keywords: Greenhouse gases, dairy cows, climate change, mitigation, emission factors.

INTRODUCCIÓN

El óxido nitroso (N₂O) es un importante gas que contribuye con el calentamiento global del planeta porque tiene un poder infrarrojo 310 veces superior al CO₂ (IPCC 2006). Por esta razón es uno de los gases con efecto invernadero (GEI) que debe ser cuantificado por los países firmantes del Protocolo de Kyoto, entre los cuales se encuentra Costa Rica.

Existen diferentes fuentes que evidencian que la adición de fertilizante nitrogenado a los suelos agrícolas incrementa el potencial de emisión del N₂O (Stehfest y Bouwman 2006; Snyder *et al.* 2009). Por esta razón el desarrollo de la agricultura ha sido directamente relacionado con el incremento atmosférico de este compuesto.

Una de las actividades donde la aplicación de fertilizantes químicos nitrogenados es una práctica común es la producción especializada de leche. En estos sistemas se aplican fertilizantes químicos nitrogenados a las pasturas para incrementar la cantidad de biomasa producida por las gramíneas en pastoreo. Sin embargo, la aplicación de N conlleva la formación y liberación de N₂O (Montenegro y Herrera, 2013), incrementando su concentración en la atmósfera y en consecuencia, contribuyendo con el calentamiento global.

En este sentido, investigaciones realizadas en el trópico han determinado la emisión de este gas proveniente del suelo bajo diferentes pasturas fertilizadas en sistemas de producción ganadera (Veldkamp *et al.* 1998; Montenegro y Abarca 2001; Montenegro y Herrera 2013; Pastrana *et al.* 2013; Piotto 2016).

En Costa Rica, diferentes especies de gramíneas y mezclas de algunas de ellas son utilizadas bajo pastoreo en los sistemas de producción especializada de leche, sin embargo, hasta la fecha no existe información relacionada con la emisión de N₂O en pasturas compuestas de dos o más especies creciendo de manera conjunta. Por ello, se requiere realizar investigación para determinar no solo la emisión de este gas, sino también determinar con mejor precisión la contribución del sector lechero a este problema global del cambio climático.

La cantidad, la fuente y el momento de la aplicación del fertilizante nitrogenado, son factores importantes que afectan tanto las respuestas al crecimiento de las pasturas como la emisión de N₂O (Bouwman *et al.* 2002; Wile *et al.* 2014). Además, condiciones del suelo como el contenido de humedad, favorecen la formación y liberación de este gas (Rowlings *et al.* 2016). Existe información previa que muestra la influencia de las estaciones climáticas en los niveles de emisión del N₂O en diferentes latitudes (Du *et al.* 2006; van der Weeden *et al.* 2016), pero en Costa Rica no existe este tipo de información.

El efecto del clima en la emisión del N₂O en pasturas ubicadas a través de Europa, fue indicado por Flechard *et al.* (2007). Diversos estudios han demostrado que la emisión de este gas está directamente relacionada con el clima (Wang *et al.* 2016) y diferentes variables del suelo (humedad, compactación, Yan *et al.* 2016). De igual manera Kiese *et al.* (2003) demostraron que en el trópico las variaciones en la emisión

de este gas están estrechamente relacionadas con la lluvia, la cual influye directamente en la humedad del suelo, factor condicionante para la formación de este gas. La lluvia es la variable que marca cambios en las estaciones climáticas en el trópico, y al variar tanta la cantidad como la intensidad de la misma entre regiones, en consecuencia, la emisión de este gas también varía significativamente entre regiones, cultivos y manejo agronómico (Grace *et al.* 2016).

Sin embargo, de acuerdo con el procedimiento de cálculo para la emisión de GEI con base en el nivel 1 del Panel Intergubernamental de Cambio

Climático (IPCC por sus siglas en inglés, 2006), la emisión de N₂O corresponde al 1% del nitrógeno (N) aplicado como fertilizante, lo cual no estaría considerando variables como las mencionadas anteriormente.

Con base a lo anteriormente descrito, el objetivo del presente trabajo consistió en caracterizar la emisión de óxido nitroso de un suelo bajo pastoreo en el trópico en un sistema de producción de leche especializada en Cartago, Costa Rica, en diferentes épocas climáticas, y estimar la emisión anual de este gas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación

La investigación se desarrolló en el 2017 en una finca lechera comercial con pastoreo intensivo ubicada a 1700 msnm en el distrito de Cot, del cantón de Oreamuno de Cartago, Costa Rica. La temperatura y precipitación anual promedio es de 16°C y 2245 mm respectivamente (IMN 2008); la zona se clasifica como bosque húmedo montano bajo (Holdridge 1979). Existe una época seca bien marcada con cuatro y medio meses de duración. Los suelos son de origen volcánico, franco arcilloso y de topografía ondulada.

Caracterización del sistema de producción

La pastura estuvo constituida por una mezcla de estrella africana (*Cynodon nlemfuensis*) y kikuyo (*Kikuyuochloa clandestina*), en proporción 50:48 respectivamente (determinada con el método de rango en peso seco de Haydock y Shaw 1975) y con el pastoreo de 60 vacas Holstein en apartos de 3500 m² durante medio día y 22 días de descanso, para una carga animal de 7,1 UA ha⁻¹.

Cada aparto recibió luego del pastoreo el fertilizante nitrogenado (23 kg de urea, 46% N), para un total anual de 483 kg N ha⁻¹. Adicional al fertilizante químico, como parte del manejo normal de la finca, se aplican purines al salir las vacas de pastorear, para un total anual de 96 kg N ha⁻¹. Esta cantidad se obtuvo multiplicando la concentración de nitrógeno en los purines aplicados (0,06±0,01%), por el volumen aplicado (4600 l), por la cantidad de rotaciones en el año.

Tratamientos

Las evaluaciones se realizaron en cada una de las épocas climáticas que se presentan a lo largo del año, las cuales fueron consideradas tratamientos:

- T1: Época seca.
- T2: Transición de la época seca a la lluviosa.
- T3: Época lluviosa.
- T4: Transición de la época lluviosa a la seca.

En cada época se utilizaron cinco cámaras estáticas para recolectar los gases, las cuales se consideraron las repeticiones.

Muestreo de N₂O

Para capturar y cuantificar la emisión de este gas, se utilizó la técnica de la cámara estática, la cual es mundialmente aceptada y mediante la cual se han obtenido los valores reportados en más del 95% de los estudios realizados (Rochette 2011). Características como costo relativamente bajo, versatilidad en el campo y facilidad de implementación son razones de su amplio uso.

Las muestras gaseosas de N₂O se recolectaron en un aparcamiento típico que representa las características de la pastura y topografía del área de pastoreo (8,1 ha), donde se ubicaron de manera aleatoria cinco cámaras estáticas para la determinación de la emisión del óxido nitroso del suelo en cada una de las épocas climáticas consideradas.

La recolección de las muestras gaseosas se efectuó en cada tratamiento considerando que las mayores emisiones de N₂O se presentan durante los primeros días luego de la salida de los animales del aparcamiento (Montenegro y Herrera, 2013). Por esta razón, en las dos primeras semanas luego de la salida de las vacas del aparcamiento, se muestreó de día por medio hasta el día 11, posteriormente se muestreó cada cinco días. El octavo muestreo se realizó el día anterior a la entrada de las vacas a pastorear nuevamente el aparcamiento. Los muestreos de gases se efectuaron durante la mañana entre las 9 a.m. y el mediodía (Alves *et al.* 2012; Noemí 2016).

Las cámaras estáticas utilizadas tenían 30 cm de altura y 94,2 cm de circunferencia, y provista de un septum por donde se recolectó la muestra gaseosa utilizando una jeringa plástica y trasvasándola inmediatamente a viales de vidrio al vacío y previamente identificados.

En cada cámara y cada día de muestreo, se recolectaron dos muestras de gas, una al momento de colocarla en el campo (t_0) y otra (t_1) 45 minutos después (Berneze *et al.* 2014; Bell *et al.* 2015); ello se hizo basado en muestreos previos que determinaron linealidad del incremento de la concentración en el tiempo de muestreo.

Las muestras gaseosas fueron analizadas en el Laboratorio de Suelos del Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA), utilizando un cromatógrafo de gases Agilent (modelo 7890A) equipado con

dos detectores: ionización de llama y de captura de electrones.

La concentración de N₂O en las muestras gaseosas, se determinó por interpolación a partir de curvas de calibración construidas con estándares de concentración conocida y trazable a NIST (Scott-Marrin, Inc., Ca.). Como control de calidad se utilizaron muestras estándar de concentración conocida, las cuales se analizaron intercaladamente con las muestras provenientes del campo.

Emisión como porcentaje del nitrógeno aplicado

La emisión de N₂O-N, para cada época climática, se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación (Sordi *et al.* 2014):

$$E (\%) = \frac{(\text{N}_2\text{O-N emitido}) \times 100}{\text{N aplicado}} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde E (%) es la emisión (porcentaje del N aplicado en el fertilizante emitido como N₂O-N), N₂O-N emitido es la cantidad de N determinado en las mediciones realizadas en el campo (kg), y N aplicado es la cantidad de N aplicado con el fertilizante (kg).

Flujo acumulado

El flujo acumulado del óxido nitroso (kg ha⁻¹) para cada época climática se calculó integrando todos los valores con base en el método de integración trapezoidal mediante la función "suma-producto" en Excel. El valor anual se obtuvo multiplicando la emisión diaria promedio de cada época climática por la duración de la misma y sumando los respectivos resultados.

Muestreo de suelo

Para determinar el efecto de la humedad del suelo en la emisión del óxido nitroso se recolectaron muestras (0-10 cm de profundidad) a la par de cada una de las cámaras estáticas cada día de muestreo de gases, utilizándose para ello un barreno tipo holandés. Cada muestra de suelo se

depositó en una bolsa plástica previamente identificada, las cuales fueron trasladadas al laboratorio de suelos del INTA, donde se determinó la humedad por gravimetría. Otro muestreo de suelo se realizó para determinar la densidad aparente mediante el método del cilindro.

Los resultados de la humedad gravimétrica se utilizaron de manera conjunta con la densidad aparente, para determinar el espacio poroso lleno de agua (EPA), forma en la cual se reporta el contenido de humedad del suelo. El EPA utiliza una escala entre 0 (suelo completamente seco) y 1 (suelo sobre saturado de agua), en el cual entre 0,30 (punto de marchitez permanente) y 0,60 (capacidad de campo) se encuentra el agua disponible para las plantas, condición que se

asocia con adecuados contenidos de humedad y oxígeno para la óptima actividad microbiana del suelo. En consecuencia, cuando los valores de EPA sobrepasan el 0,60, se incrementa la limitación de oxígeno del suelo y con ello se favorecen las condiciones para la formación del N₂O (Linn y Doran 1984).

Diseño y análisis estadístico

Se implementó un diseño irrestricto al azar con cuatro tratamientos y cinco repeticiones. El análisis estadístico se realizó mediante un ANDEVA y se compararon las medias de las diferentes épocas climáticas utilizando la diferencia mínima significativa en Infostat (Di Rienzo *et al.* 2015).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de la emisión de N₂O

El comportamiento de la emisión del N₂O mostró variabilidad a lo largo del período evaluado en cada una de las épocas climáticas, lo cual fue más evidente durante la lluviosa y de transición a la seca (Figura 1). Aunque el patrón de emisión fue similar para todas las épocas, la mayor magnitud se determinó durante los primeros días de evaluación.

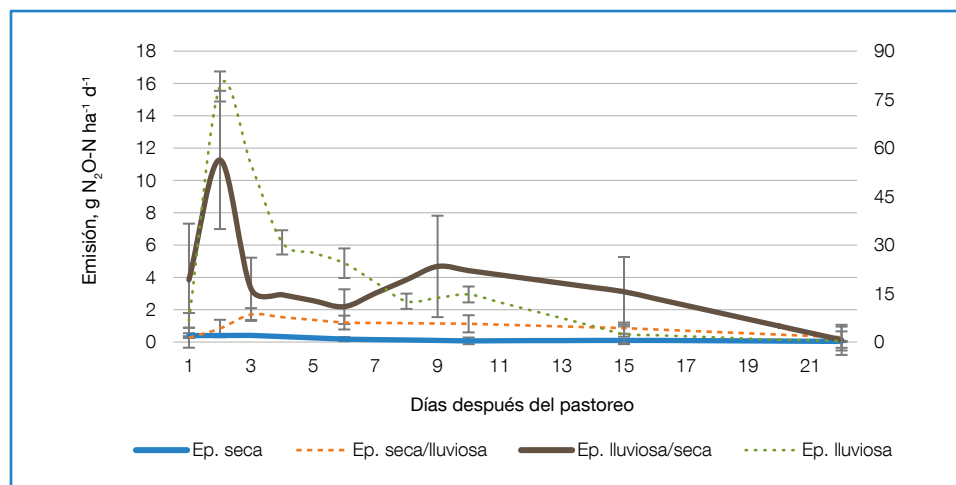


Figura 1. Patrón de emisión de N₂O-N, durante diferentes épocas climáticas, en un suelo cubierto con gramíneas bajo pastoreo. Costa Rica. 2018.

De manera general para todas las épocas, a partir del día 10 después del pastoreo y para todos los casos, la emisión disminuyó y se estabilizó en valores cercanos a cero (Figura 1).

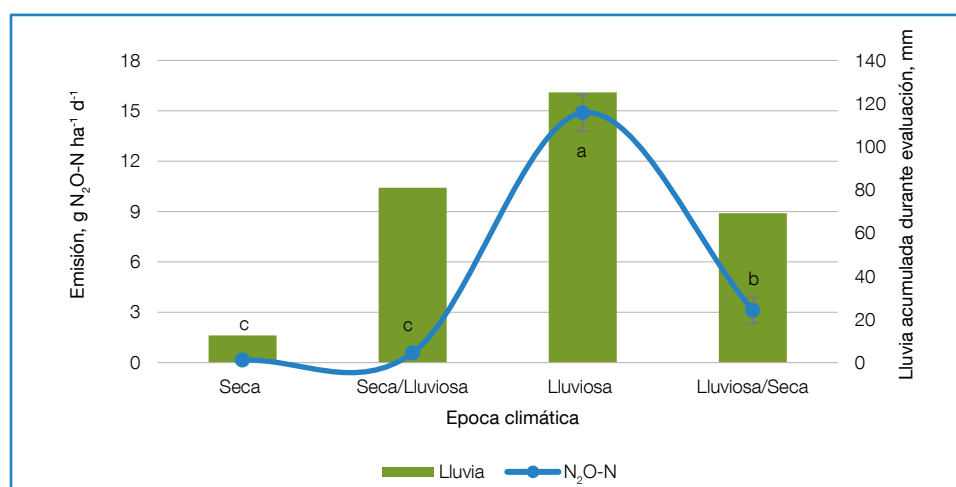
La aplicación del nitrógeno químico y el proveniente de los purines, además del de las excretas de los animales en pastoreo, contribuyeron a la formación y liberación del N₂O durante los primeros días luego del pastoreo durante la época lluviosa (Figura 1). La emisión determinada en la época seca fue muy baja, esta se observa como línea continua en la base de la figura 1.

Con relación a las épocas de transición, estas mostraron magnitudes diferentes en términos de la cantidad de óxido nitroso emitida; la mayor se presentó en la transición a la época seca con

respecto a la transición a la época lluviosa, probablemente relacionada con la cantidad de agua recibida y presente en el suelo.

Efecto de la época climática en la emisión de óxido nitroso

La emisión de N₂O mostró ser variable a lo largo del año con diferencias importantes ($P < 0,001$) entre épocas climáticas (Figura 2). Los mayores valores diarios se presentaron en la época lluviosa, mientras que los menores durante la seca y durante la transición de la época seca a la lluviosa. Durante la transición de la época lluviosa a la seca, se determinaron valores intermedios aunque diferentes de los anteriores.



Valores promedio de N₂O ± 1 EE con diferente letra difieren al nivel $P < 0,05$

Figura 2. Emisión promedio diaria de N₂O-N, según época climática, en un suelo cubierto con gramíneas bajo pastoreo. Costa Rica. 2018.

Esto claramente demuestra la importancia de considerar las condiciones propias de cada localidad, particularmente aquellas relacionadas con la variación intra anual del clima cuando se pretende desarrollar un factor de emisión, ya que de esta forma se estará incluyendo la influencia del clima y ello se reflejará en el factor de emisión determinado.

Diferentes investigaciones realizadas (Barton *et al.* 2008; Kiese *et al.* 2003) han demostrado la variabilidad temporal de las emisiones de N₂O en una amplia variedad de sistemas de uso del suelo, variaciones que son estimuladas entre

otros factores por el contenido de humedad y el N disponible en el suelo.

La influencia integrada de los diferentes factores del suelo (principalmente contenido de oxígeno y humedad en el suelo) son claves en la regulación de la magnitud de la emisión, condiciones que están directamente relacionadas con aspectos climáticos.

El clima y las variaciones estacionales del mismo que ocurren a lo largo del año, han sido mencionados como importantes factores que influyen en la emisión de N₂O. De acuerdo con van

der Weerden *et al.* (2016), gran parte de la variación observada en las emisiones de óxido nitroso se explican por el efecto de las estaciones del año; esto coincide con nuestros resultados los cuales mostraron que la mayor variación en la emisión anual se explican por las épocas climáticas típicas que se presentan a lo largo del año.

Las variaciones estacionales determinadas en la emisión de este gas en la presente investigación, también fueron coincidentes con las reportadas para una pastura de *Brachiaria brizantha* cv Marandú en la Amazonía brasileña, donde Nogueira *et al.* (2015) determinaron variaciones importantes en la emisión del N₂O como resultado de la época climática, ya que esta fue mayor durante la época lluviosa comparada con la detectada en la época seca.

De igual forma, Luo *et al.* (2007) en Nueva Zelanda reportaron variaciones importantes en la emisión como resultado de la época climática, la cual presentó un rango desde 0% durante la época seca, hasta 1,56% del N aplicado para la

época lluviosa. La misma tendencia fue reportada por Wang *et al.* (2016) en Australia.

Efecto de la humedad del suelo

Durante la época lluviosa, las fluctuaciones en el contenido de humedad del suelo reflejan la influencia de la precipitación, la cual se incrementa luego de los eventos lluviosos (Figura 3). De manera similar, aunque con menor magnitud, durante la época seca se incrementó la humedad del suelo por la aplicación de purines al inicio del período de evaluación, y por eventuales pequeños eventos lluviosos ocurridos durante el período de evaluación.

Hubo diferencia en los contenidos de humedad del suelo entre las diferentes épocas climáticas, particularmente durante la época lluviosa y la seca, así como las tendencias observadas durante las condiciones de transición (Figura 3).

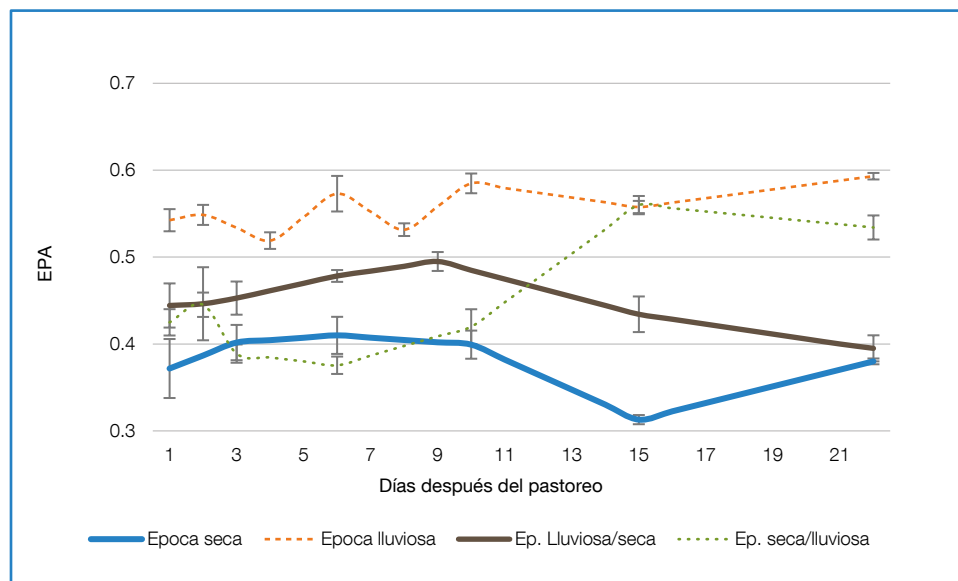


Figura 3. Espacio poroso lleno de agua (EPA) durante diferentes épocas climáticas en un suelo cubierto con gramíneas bajo pastoreo. Costa Rica. 2018.

Los niveles de humedad del suelo determinados en la época lluviosa, probablemente no llegaron a reducir de manera significativa el oxígeno en el suelo como sucede cuando se sobrepasa 0,60 del EPA (Khalil y Baggs 2005). Sin embargo, la cantidad de agua en el espacio poroso del suelo sí se incrementó sustancialmente comparado con las otras épocas climáticas, y contribuyó a la formación del N₂O. Niveles inferiores a 0,40 del EPA no favorecieron la formación de N₂O durante la época seca (Eckard *et al.* 2003).

Las épocas de transición mostraron comportamientos diferentes en la emisión de óxido nitroso (Figura 1) y ello se explica en parte por la lluvia recibida y en consecuencia, por la humedad del suelo (Figura 3).

Durante la transición de la época seca a la lluviosa, con la excepción del segundo día de evaluación, se incrementó el contenido de humedad del suelo como resultado de un evento lluvioso y la adición de purines. En términos promedio, el EPA fue de aproximadamente 0,40 durante los primeros 12 días de evaluación (Figura 3), condición que no favorece la formación de N₂O (Eckard *et al.* 2003).

Hacia el final de este periodo de transición (de seco a lluvioso), y producto de eventos lluviosos importantes, el EPA se incrementó a valores cercanos a 0,55 (Figura 3) típicos de la época lluviosa, pero no tuvieron efecto alguno en la emisión de N₂O-N (Figura 1). Caso contrario se observó en la transición de la época lluviosa a la seca, donde se determinó reducción del EPA (Figura 3), por la disminución de las lluvias (Figura 2). Estas condiciones influyeron en las emisiones (Figura 1) determinadas durante las épocas climáticas comentadas.

De manera general, los valores de EPA se incrementaron al inicio del período de evaluación (Figura 3) debido a la influencia de los purines y los eventos lluviosos ocurridos.

Los valores de humedad del suelo y de emisión de N₂O-N no mostraron correlación significativa, sin embargo, si mostraron clara tendencia a que

los valores de emisión sean más altos cuando la humedad se incrementa. Ello se observó claramente en la figura 2.

En este sentido, Rowlings *et al.* (2016), también determinaron que la emisión varió estacionalmente como resultado del EPA producto de los eventos lluviosos. Cuando el espacio poroso lleno de agua es inferior a 0,40, la formación de N₂O a partir de la nitrificación es normalmente baja, pero si los valores de EPA se incrementan hasta niveles de 0,55-0,65, la formación del óxido nitroso igualmente se aumenta.

Los resultados mostraron que cuando los valores de EPA estaban en el rango de 0,50-0,60, se determinaron las mayores emisiones, lo que hace suponer que este proceso es mayoritariamente resultado de la nitrificación. De acuerdo con lo reportado por Oertel *et al.* (2016), en lo referente a la producción de N₂O proveniente del suelo, la emisión de este gas es óptima cuando el EPA es de alrededor de 0,60.

Los resultados también concuerdan con informes anteriores que indican que la humedad del suelo es uno de los factores que desencadenan las emisiones de N₂O en pastos tropicales (Keller y Reiners 1994; Veldkamp *et al.* 1998), y estas son más bajas que las determinadas previamente por Montenegro y Abarca (2001) en nuestro país, probablemente debido a que se utilizó una fuente de N amoniacal como la urea.

En este sentido Klein *et al.* (2001), determinaron factores de emisión de N₂O de 0,1% -1,9% (promedio 0,6%) cuando se aplicó urea como fuente de N, y de 0,08% -12% (promedio 2,9%) cuando se aplicó N como alguna forma de nitrato. Del mismo modo, Eckard *et al.* (2003) informaron que las pérdidas promedio de N₂O fueron 12,9% mayores con nitrato de amonio que con urea.

Según parece, el fertilizante nitrogenado basado en nitrato produce mayores emisiones de N₂O en relación con las fuentes de N amoniacal cuando se aplica al pasto en crecimiento activo, lo cual podría ser el resultado de que el nitrato es un precursor de este gas.

Emisión anual de N₂O-N y factor de emisión

La emisión anual fue de 2,40±0,21 kg de N₂O-N ha⁻¹ año⁻¹, lo cual representa 0,41% del nitrógeno aplicado considerando tanto el proveniente de la urea como de los purines. Este valor es inferior al sugerido por el nivel I de la metodología de cálculo de inventarios de gases con efecto invernadero (IPCC 2006) para estimar las emisiones de óxido nitroso. Ello demuestra la importancia de desarrollar factores de emisión nacional, ya que los mismos reflejan no solo el manejo implementado en el sistema de producción, sino también las condiciones climo-edáficas del lugar donde se desarrollan las actividades ganaderas.

La emisión anual determinada en esta investigación fue inferior al factor de emisión sugerido por el IPCC (2006), situación que coincide con diferentes trabajos de investigación. Por ejemplo, Charles *et al.* (2017) en un análisis global de factores de emisión utilizando fertilizantes químicos determinaron valores menores del 1% del N aplicado. Cuando se analizaron los resultados de diversas investigaciones realizadas en Nueva Zelanda por Weerden *et al.* (2016), donde se aplicó urea y purines de manera conjunta, se determinó que el valor promedio del factor de emisión fue de 0,46%. Similarmente, los resultados de Klein *et al.* (2001), Galbally *et al.* (2005) y de Harty *et al.* (2016) mostraron factores de emisión en el rango de 0,1 a 0,49% del N aplicado.

De acuerdo con Bouwman *et al.* (2002), el factor de emisión sugerido por el IPCC (2006), se basa en una serie de observaciones las cuales en su mayoría (aproximadamente 75%) provienen de latitudes media caracterizadas por climas de “verano suave e invierno frío”. En consecuencia, este factor proporciona estimaciones adecuadas de la emisión de este gas para localidades particularmente en esas latitudes, por lo tanto bajo las condiciones climo-edáficas del trópico que son diferentes a donde se determinó el coeficiente, es probable que los resultados al utilizar este factor no reflejen lo que realmente ocurre en términos de emisión.

Es por esta razón que los datos obtenidos bajo las condiciones propias de cada país, proporcionan mejor base para calcular las emisiones y pueden contribuir a racionalizar el uso de los fertilizantes nitrogenados cuando se asocian las dosis de fertilizante aplicado con la producción de biomasa de las pasturas. Esto es apoyado por

el hecho de que datos disponibles de áreas tropicales indican que al utilizar el factor de emisión utilizado por el IPCC se sobreestima los flujos medidos (Alves *et al.* 2010; Cruvinel *et al.* 2011).

La emisión de óxido nitroso fue baja en la época seca y durante la transición de la época seca a la lluviosa. Las mayores emisiones se presentaron durante la época lluviosa, lo cual mostró la influencia directa del nivel de humedad del suelo en la emisión. El patrón de emisión mostró que luego de los eventos lluviosos que ocurrieron inmediatamente después del pastoreo, la magnitud de la emisión disminuyó y se mantuvo en valores basales luego de la segunda semana de evaluación. Esto es apoyado por la correlación positiva determinada entre ambas variables.

La determinación de la emisión anual de N₂O por unidad de área para actividades productivas desarrolladas bajo las condiciones agroecológicas propias de nuestro país, contribuye notoriamente a conocer con bajo nivel de incertidumbre, la realidad del aporte de gases con efecto invernadero que se derivan directamente de las actividades pecuarias, que como se demuestra en la presente investigación, fue inferior al valor sugerido por el IPCC.

La utilización de factores de emisión nacionales, también permite que los inventarios nacionales de gases reflejen tanto las condiciones agroclimáticas en las cuales se desarrollan las actividades agropecuarias como el manejo de las mismas, lo cual no es posible con la utilización de factores de emisión generados en otras latitudes.

Adicionalmente, debido a los cambios estacionales del clima durante el año, se hace necesario considerarlas cuando se cuantifica la emisión de GEI, ya que como se demostró, la emisión varía sustancialmente entre épocas climáticas.

Finalmente, se recomienda realizar evaluaciones para determinar la respuesta de esta mezcla de pastos a la fertilización nitrogenada, de manera que se pueda recomendar la dosis de nitrógeno en función de la cantidad de biomasa requerida para las vacas en pastoreo y así racionalizar la utilización de este insumo. Esta podría ser una estrategia para mejorar la eficiencia de la utilización del nitrógeno y reducir las emisiones de este poderoso gas con efecto invernadero.

LITERATURA CITADA

- Alves, B; Smith, K; Flores, R; Cardoso, A; Oliveira, W; Jantalia, C; Urquiaga, S; Boddey, R. 2012. Selection of the most suitable sampling time for static chambers for the estimation of daily mean N₂O flux from soils. *Soil Biology and Biochemistry* 46:129-135.
- Alves, B; Jantalia, C; Madari, B; Machado, P; Franchini, J; dos-Santos, J; Boddey, R; Urquiaga, S. 2010. Emissões de óxido nitroso de solos pelo uso de fertilizantes nitrogenados em áreas agrícolas. *Embrapa Agrobiologia* 126:1-6.
- Barton, L; Kiese, R; Gatter, D; Butterbach-Bahl, K; Buck, R; Hinz, C; Murphy, D. 2008. Nitrous oxide emissions from a cropped soil in a semi-arid climate. *Global Change Biology* 14:177-192.
- Barneze, A; Mazzetto, A; Zani, C; Misselbrook, T; Cerri, C. 2014. Nitrous oxide emissions from soil due to urine deposition by grazing cattle in Brazil. *Atmosphere and Environment* 92:394-397.
- Bell, M; Rees, R; Cloy, J; Topp, C; Bagnall, A; Chadwick, R. 2015. Nitrous oxide emissions from cattle excreta applied to a Scottish grassland: Effects of soil and climatic conditions and a nitrification inhibitor. *Science of the Total Environment* 508:343-353.
- Bouwman, A; Boumans, L; Batjes, N. 2002. Emissions of N₂O and NO from fertilized fields: Summary of available data. *Global Biogeochemical Cycles* 16:1058-1071.
- Charles, A; Rochette, P; Whalen, J; Angers, D; Chantigny, M; Bertrand, N. 2017. Global nitrous oxide emission factors from agricultural soils after addition of organic amendments: A meta-analysis. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 236(2):88-98.
- Cruvinel, E; Bustamante, M; Kozovitsc, A; Zeppd, A. 2011. Soil emissions of NO, N₂O and CO₂ from croplands in the savanna region of central Brazil. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 144:29-40.
- Di Rienzo, J; Casanoves, F; Balzarini, M; Gonzalez, L; Tablada, M; Robledo, C. 2015. InfoStat versión 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, ARG.
- Du, R; Lu, D; Wan, G. 2006. Diurnal, seasonal, and inter-annual variations of N₂O fluxes from native semi-arid grassland soils of inner Mongolia. *Soil Biology and Biochemistry* 38:3474-3482.
- Eckard, R; Chen, D; White, R; Chapman, D. 2003. Gaseous nitrogen loss from temperate perennial grass and clover dairy pastures in south eastern Australia. *Australian Journal of Agricultural Research* 54:561-570.
- Flechard, C; Ambus, P; Skiba, U; Rees, R; Hensen, A; van Amstel, A; van den Pol-van, A; Soussana, J; Jonesk, M; Clifton-Brown, J; Raschi, A; Horvath, L; Neftel, A; Jocher, M; Ammann, C; Leifeld, J; Fuhrer, J; Calanca, P; Grosz B. 2007. Effects of climate and management intensity on nitrous oxide emissions in grassland systems across Europe. *Agriculture Ecosystems and Environment* 121:135-152.
- Galbally, I; Meyer, C; Bentley, S; Weeks, I; Leuning, R; Kelly, K; Phillips, F; Barker-Reid, F; Gates, W; Baigent, R; Eckard, R; Grace, P. 2005. A study of environmental and management drivers of non-CO₂ greenhouse gas emissions in Australia agro-ecosystems. *Environmental Science* 2:133-142.
- Grace, P; Shcherbak, I; Macdonald, B; Scheer, C; Rowlings, D. 2016. Emission factors for estimating fertiliser-induced nitrous oxide emissions from clay soils in Australia's irrigated cotton industry. *Soil Research* 54:598-603.
- Harty, M; Forrestal, P; Watson, C; McGeough, K; Carolan, R; Elliot, C; Krol, D; Laughlin, R; Richards, K; Lanigan, G. 2016. Reducing nitrous oxide emissions by changing N fertiliser use from calcium ammonium nitrate (CAN) to urea based formulations. *Science of the Total Environment* 563-564:576-586.
- Haydock, K., Shaw, N. 1975. The comparative yield method for estimating dry matter yield of pasture. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry*, 15, 663-670.

- Holdridge, L. 1979. Ecología basada en zonas de vida, Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. San José, Costa Rica.
- Instituto Meteorológico Nacional (IMN). 2008. Clima, variabilidad y cambio climático en Costa Rica. Segunda Comunicación Nacional. 75 p.
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate change). 2006. Guidelines for national greenhouse gas inventories. Prepared by the national greenhouse gas inventories programme. Vol 4. IGES, JPN.
- Keller, M; Reiners, W. 1994. Soil atmospheric exchange of nitrous-oxide, nitric-oxide, and methane under secondary succession of pasture to forest in the Atlantic lowlands of Costa Rica. *Global Biogeochemical Cycles* 8:399-409.
- Klein, C; Sherlock, R; Cameron, K; van der Weerden, T. 2001. Nitrous oxide emissions from agricultural soils in New Zealand—a review of current knowledge and directions for future research. *Journal of the Royal Society of New Zealand* 31:543-574.
- Khalil, M; Baggs, E. 2005. CH₄ oxidation and N₂O emissions at varied soil water-filled pore spaces and headspace CH₄ concentrations. *Soil Biology and Biochemistry* 37:1785-1794.
- Kiese, R; Hewett, B; Graham, A; Butterbach-Bahl, K. 2003. Seasonal variability of N₂O-emissions and CH₄-uptake from/by a tropical rainforest soil of Queensland, Australia. *Global Biogeochemical Cycles* 17:1043-1056.
- Linn, D; Doran; J. 1984. Effect of water-filled pore space on carbon dioxide and nitrous oxide production in tilled and nontilled soils. *Soil Science Society of America Journal* 48:1267-1272.
- Luo, J; Ledgard, S; Lindsey, S. 2007. Nitrous oxide emissions from application of urea on New Zealand pasture. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 50:1-11.
- Montenegro, J; Abarca, S. 2001. Importancia del sector agropecuario costarricense en la mitigación del cambio climático. MAG-IMN, San José, CR.
- Montenegro, J; Herrera, J. 2013. Determinación de la emisión de óxido nitroso en pasto kikuyo (*Kikuyuochloa clandestina*) bajo pastoreo: Efecto de diferentes fuentes y niveles de nitrógeno. *Tópicos Meteorológicos y Oceanográficos* 12:9-21.
- Noemí, V. 2016. Factores y procesos que afectan la emisión de óxido nitroso en un suelo pampeano manejado con siembra directa. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires, Facultad de Agronomía. 131 p.
- Nogueira, A; Rodrigues, R; Castro, B; Nogueira, T; da Silva, J; Behling, M; Mombach, M; Armacolo, N. Silveira, J. 2015. Emissões de óxido nitroso e metano do solo em áreas de recuperação de pastagens na Amazonia Matogrossense. *Química Nova* 38:937-943.
- Oertel, C; Matschullat, J; Zurba, K; Zimmermann, F; Erasmí, S. 2016. Greenhouse gas emissions from soils—A review. *Chemie der Erde* 76:327-352.
- Pastrana, I; Reza, S; Espinosa, M; Suárez, E; Díaz, E. 2013. Efecto de la fertilización nitrogenada en la dinámica del óxido nitroso y metano en *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweickhardt. *Revista Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 12(2):134-142.
- Piotto, V. 2016. Mitigação da emissão de gases de efeito estufa em pasto de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu sob pastejo. Tesis Ph. D. Facultad de zootecnia e ingeniería de alimentos. Universidad de Sao Paulo, BRA.
- Rochette, P. 2011. Towards a standard non-steady-state chamber methodology for measuring soil N₂O emissions. *Animal Feed Science and Technology* 166-167:141-146.
- Rowlings, D; Grace, P; Scheer, C; Liu, C. 2016. Rainfall variability drives interannual variation in N₂O emissions from a humid, subtropical pasture. *Science of the Total Environment* 512-513:8-18.
- Sordi, A; Dieckow, J; Bayer, C; Amaral, M; Thiago, J; Acordi, J; Moraes, A. 2014. Nitrous oxide emission factors for urine and dung patches in a subtropical Brazilian pastureland. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 190:94-103.
- Snyder, C; Bruulsema, T; Jensen, T; Fixen, P. 2009. Review of greenhouse gas emissions from crop production systems and fertilizer management effects. *Agriculture Ecosystems and Environment* 133:247-266.

Stehfest, E; Bouwman, L. 2006. N₂O and NO emission from agricultural fields and soils under natural vegetation: summarizing available measurement data and modelling of global annual emissions. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 74(3):207-228.

Van der Weerden, T; Cox, N; Luo, J; Dic, H; Podolyan, A; Phillips, R; Saggar, S; de Klein, C; Ettem, P; Rys, G. 2016. Refining the New Zealand nitrous oxide emission factor for urea fertiliser and farm dairy effluent. *Agriculture Ecosystems and Environment* 222:133-137.

Veldkamp E; Keller, M; Nuñez, M. 1998. Effect of pasture management on N₂O and NO emissions from soil in the humid tropics of Costa Rica. *Global Biogeochemical Cycles* 12:71-79.

Wang, W; Park, G; Reeves, S; Zahmel, M; Heenan, M; Salter B. 2016. Nitrous oxide emission and

fertilizer nitrogen efficiency in a tropical sugarcane cropping system applied with different formulations of urea. *Soil Research* 54:572-584.

Wile, A; Burton, D; Sharifi, M; Lynch, D; Main, M; Papadopoulos, Y. 2014. Effect of nitrogen fertilizer application rate on yield, methane and nitrous oxide emissions from switchgrass (*Panicum virgatum* L.) and reed canarygrass (*Phalaris arundinacea* L.). *Canadian Journal of Soil Science* 94:129-137.

Yan, R; Tang, H; Xin, X; Chen, B; Murray, P; Yan, Y; Wang, X; Yang, G. 2016. Grazing intensity and driving factors affect soil nitrous oxide fluxes during the growing seasons in the Hulunber meadow steppe of China. *Environmental Research Letters* 11:1-12.

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento especial a la señora Doris Ivankovich, dueña de la Finca Duraznal, ya que permitió el desarrollo de la presente investigación, lo cual fue clave poder generar la información que se presenta en este artículo.

Se agradece también a la Agencia para el Desarrollo Internacional del Gobierno de los Estados Unidos de América (USAID), que a través del proyecto EC-LEDS II, financió parcialmente esta investigación, la cual fue realizada en el marco del Acuerdo interinstitucional entre el Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA), Costa Rica y el Instituto Meteorológico Nacional (IMN), en colaboración con la Universidad Técnica Nacional (UTN), Costa Rica, Sede Atenas.

EFFECTO DE SOLARIZACIÓN BIOLÓGICA CON POLIETILENOTRICAPA SOBRE LA VIABILIDAD DE QUISTES DE *GLOBODERA* SPP.

Ricardo Piedra Naranjo¹

RESUMEN

Efecto de solarización biológica con polietilenotricapa sobre la viabilidad de quistes de *Globodera* spp. La investigación se estableció a altura de 3200 m s.n.m., en suelo de origen volcánico orden Andisol. Una temperatura promedio de 3°C a 17°C, una precipitación lluviosa de 2100 mm y 85% de humedad relativa. Su ubicación esta 9° 58.5812' latitud norte, 83° 49.7996' longitud oeste. Se evaluó el efecto de la solarización biológica con polietilenotricapa para el control de quistes de *Globodera* sp. en una parcela con plástico y otra parcela en descanso. Los resultados fueron analizados con la prueba t-Student al 0.05%. En laboratorio se identificaron diferencias significativas entre las variables larvas y huevos por quiste y larvas y huevos/g de suelo seco. Los meses que presentaron mayor temperatura fueron febrero, marzo, abril y mayo, comprendiendo las horas entre las 10:30 a.m. y las 3:30 p.m. para un promedio de 39,20 °C. Los meses con menores temperaturas fueron: junio, julio, agosto y octubre para un promedio de 19,20°C. En la parcela con polietilenotricapa, se observó la eliminación en la población de arvenses y parcialmente el aporco o remanente del cultivo de papa. El muestreo inicial en esta parcela en la variable de larvas y huevos/g de suelo seco, fue de 93,00 y finalizó con 12,49. Para el caso del tratamiento sin plástico, las poblaciones de larvas y huevos/g de suelo seco iniciaron con un 94,00 y finalizaron con 130,25. El análisis microbiológico demostró que la parcela solarizada eliminó el patógeno *Pythium* sp, en parcela sin plástico finalizó con la presencia de los microorganismos fitopatógenos: *Phytophthora* sp., *Pythium* sp., *Ralstonia solanacearum* y *Pseudomonas* sp. En general la parcela tratada con solarización demostró un efecto de eficacia de 87% en la viabilidad de larvas y huevos por quiste.

Palabras claves: Polietilenotricapa, solarización, viabilidad, eficacia, larvas, huevos.

Key words: Polyethylenetricapa, solarization, viability, efficacy, larvae, eggs.

INTRODUCCIÓN

En el año 2016 el cultivo de papa en Costa Rica alcanzó 97.979 toneladas y un área sembrada de más de 3.600 hectáreas. Por otro lado, y según, Avilés y Piedra (2016), los costos totales para el establecimiento de papa mediante el manejo convencional en Costa Rica rondan los ₡4.916.694,94 por hectárea. Las importaciones

para ese mismo año no superaron el 3.12%. Este cultivo es un alimento muy nutritivo; desempeña funciones energéticas, debido a su alto contenido de almidón, y funciones reguladoras del organismo, por su elevado contenido de vitaminas hidrosolubles, minerales y fibra. Se consideraba que era un alimento nutritivamente pobre, pero en

1. Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria, INTA. rpiedra@inta.go.cr. ORCID: 0000-0002-1433-1834. Sede del Laboratorio de Fitoprotección del INTA. Sabana Sur, San José.

realidad aporta más nutrientes que energía al organismo. En Costa Rica la mayoría de la población tiene acceso a este alimento, ya que se produce durante todo el año. Una hectárea de papa puede rendir la misma cantidad de alimento que dos a cuatro hectáreas de granos básicos; además, produce el doble de proteínas por hectárea que el trigo (Espinoza 2014).

La papa al igual que otros cultivos no escapa al ataque de plagas y enfermedades. Una de las plagas más importantes ha sido *Globodera* spp, por ser una plaga cuarentenaria. En Costa Rica, el primer registro de *Globodera* spp. fue en 1973, cuando Ramírez y Bianchini, indicaron la presencia de *G. rostochiensis* en 18 fincas ubicadas en Cartago entre los años 1972 y 1974. Sin embargo, en los siguientes años no se logró determinar su presencia y las pruebas de patogenicidad en dos variedades de papa fueron negativas (Humphrey, 2006). La plaga fue confirmada hasta enero del año 2005, en una investigación realizada por el Laboratorio de Nematología de la Universidad de Costa Rica, en una finca cultivada con la variedad Floresta, ubicada en las cercanías del volcán Irazú (Coto, 2005). Entre otras consideraciones de esta plaga, en la actualidad existe una nueva especie, *G. ellingtonae*, un estudio de sus características fue identificada y publicada en Oregón en 2014, *G. ellingtonae* fue identificado en raíces de papas del norte de Argentina (Skantar *et al.*, 2011).

Según Franco (1986) la presencia del nematodo en cualquier región o país conlleva a varias consecuencias tales como: reducción de rendimiento productivo en función de la población del nematodo, problemas comerciales entre países, tanto de papa comercial como de semilla certificada y registrada, diseminación a otras localidades de producción por falta de controles fitosanitarios debido al comercio de semilla entre fincas, lo cual favorece que la plaga se propague. Por otra parte, los productores compran las semillas con una calidad desconocida y en algunos casos, la semilla ha sido sembrada sucesivamente, provocando la degradación de su calidad y haciéndola más susceptible al nematodo y degeneración por virus. Los nematodos de mayor importancia en el cultivo de papa han sido *Meloidogyne* sp, *Globodera* sp, y *Pratylenchus* sp (Palomares *et al.* 2014; Luc *et al.* 2005). De acuerdo con Crozzoli (1994) las plagas agrícolas como *Globodera* spp.

han tratado de ser controladas durante años mediante el uso de plaguicidas químicos provocando un fuerte impacto sobre los organismos benéficos presentes en el suelo y el ambiente.

En la actualidad el uso de la solarización por parte de los agricultores es sumamente bajo, la mayoría de los técnicos y agricultores solo tienen conocimiento parcial o no conocen la técnica de solarización. Aquellos que han usado la solarización manifiestan que es una alternativa importante y que da buenos resultados, pero señalan algunas limitaciones tales como: el alto costo del plástico, tiempo de espera y en algunos casos efectividad errática en el control de malezas como *C. rotundus* y los nematodos (FAO 1995). Existe un sistema de solarización con cobertura hermética del suelo, humedeciendo el suelo y posteriormente se pone el plástico transparente UV, durante un tiempo definido (Katan y DeVay, 1991).

La solarización se ha definido como el calentamiento del suelo cubriéndolo con plástico transparente durante un tiempo definido donde exista una mayor radiación solar, logrando así, un incremento en la temperatura que destruya microorganismos patógenos que afectan cultivos agrícolas, las temperaturas pueden alcanzar de 45 a 55 °C en capas superficiales y de 40 a 45 °C a 25 cm de profundidad, tiene otra característica que elimina arvenses como efecto herbicida (Hernández 2013). Otros estudios demuestran que algunos organismos de suelo soportan temperaturas con un umbral térmico cercano a los 37 °C, de tal manera que usando solarización puede cubrir varias explotaciones agropecuarias en programas de control de plagas y enfermedades (Stapleton *et al.*, 2000). Por otro lado, usando protección vegetal o residuos vegetales, se puede obtener un control biológico y cultural, de manera que es aplicable de forma manejo integrado y orgánica con la solarización (Arboleya *et al.* 2006).

Según Davis (1991), la solarización puede controlar una gama de organismos patógenos de suelo como: *Pythium ultimum*, *Pythium* spp., *Verticillium albo-atrum*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotium cepivorum*; entre los nematodos *Ditylenchus dipsacii*, *Meloidogyne javanica* y, entre las malezas, *Poa annua*, *Echinochloa crusgalli*, *Malva parviflora*, *Stellaria media*, *Portulaca oleracea*, *Lamium amplexicaule*,

Chenopodium album, *Digitaria sanguinalis*, *Ipomoea* spp., *Amaranthus retroflexus*, *Anoda cristata* y *Senecio vulgaris*. Existen algunas experiencias del control de nematodos fitoparásitos, solarizando por 50 días con temperaturas promedio de 60 °C se obtuvo un excelente control (Bernal, 2005).

La biofumigación con enmiendas orgánicas junto con la solarización transforma gases y otros productos de biodegradación que pueden ser utilizados como fumigantes para el control de los organismos patógenos de vegetales, además del poco impacto ambiental, contribuye que su eficacia se incrementa cuando se incorpora dentro de un sistema de manejo integrado de cultivos (Bello 1998). En Costa Rica, como en muchas otras partes del mundo, la solarización o calentamiento del suelo por irradiación solar mediante el empleo de coberturas plásticas, se ha considerado una alternativa no química importante en el control de malezas y patógenos, especialmente en almácigos. Esporádicamente la solarización se ha utilizado también en cultivos de alta rentabilidad, en los que por alguna razón no se desea

aplicar plaguicidas. El método es poco utilizado, ya que es desconocido por los agricultores. Las investigaciones con esta técnica han sido dirigidas principalmente al control de algunos patógenos y malezas en varios cultivos en almácigos (FAO 1995).

La solarización debe tener algunas características y se menciona dos principales: Una: la temperatura del aire es mucho mejor en la época seca o del año más alta; otra característica es la humedad del suelo, necesaria para incrementar la sensibilidad y conductividad térmica para el control de los objetivos que queremos controlar facilitando la actividad biológica. En el caso de suelos de textura pesada (del tipo arcilloso, limoarcillosos) es suficiente con un riego antes de colocar el plástico. En otro contexto suelos de textura liviana es importante hacer algún tipo de riego antes de solarizar (Horiuchi, 1991). Por tanto; se definió el objetivo de evaluar el efecto de la solarización con polietileno tricapa contra poblaciones de *Globodera* spp, en área infestada y con historial de siembra consecutiva de papa.

METODOLOGÍA

El estudio se ubicó en la pastora provincia de Cartago, una altura de 3200 m s.n.m. predomina el Bosque muy húmedo montano, el suelo es de origen volcánico del orden Andisol. La temperatura, precipitación y humedad relativa promedio anual es de 3°C a 17°C, 2 100 mm y 85%, respectivamente. Su ubicación es 9° 58.5812' latitud norte 83° 49.7996' longitud oeste.

Área de estudio

Las parcelas evaluadas tenían un historial de la plaga y siembras sucesivas del cultivo de papa. El tamaño de cada parcela fue de 100 m² (figura 1 y 2). En cada parcela, los muestreos se realizaron en forma de zigzag, con 10 submuestras para una

muestra compuesta, de la cual se analizaron 250 g para la extracción de quistes. En la parcela con polietileno tricapa para la toma de temperatura del suelo, se utilizó una estación portátil semi-automatizada que registró datos diarios por debajo del plástico a una profundidad de 15 cm (figura 1 y 2)

En cada parcela se utilizaron 10 submuestras por cada muestra, para su respectivo análisis. Los resultados de la viabilidad de los quistes con sus variables fueron analizados con la prueba estadística de t- Student. Los datos del software fueron tomados durante los nueve meses, en un rango entre las 10:30 a.m. y 3:30 p.m. Se tomaron datos de la temperatura sobre el plástico y a 15 cm de profundidad. Los muestreos se realizaron de febrero a octubre del 2018.



Figura 1. Montaje de plástico en área solarizada. San Juan de Chicué, Cartago, 2018.

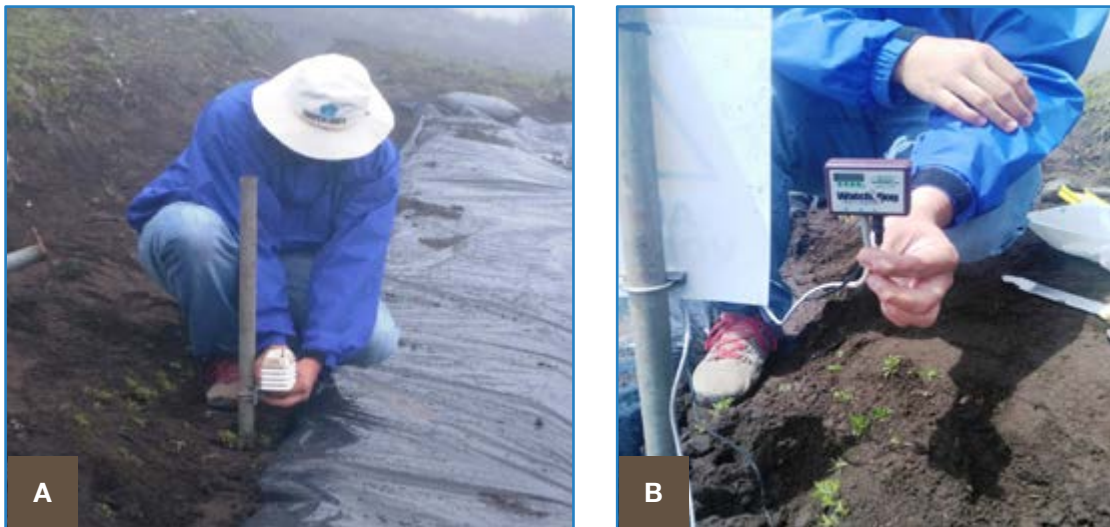


Figura 2. (A) Instalación de Data-logger, toma de datos de temperatura a 15 cm del suelo. (B). San Juan de Chicué, Cartago, 2018.

Extracción de quistes

Para la extracción de quistes de suelo se utilizó el sistema de Fenwick modificado, Fenwick (1940), Ostenbrink (1950). Este método consiste en un embudo colocado sobre un recipiente el cual en su parte ensanchada tiene un tamiz con poros de 1 mm de diámetro en la cual se deposita la muestra de suelo. El instrumento es de forma trapezoidal en su parte inferior. Presenta los soportes del embudo y una aleta inclinada que bordea el recipiente como collar, pero termina en su solo conducto (figura 3A). La muestra al caer

al depósito inferior del instrumento hace que los residuos orgánicos precipiten al fondo y la materia más liviana flote, la cual es recogida por un tamiz de 100 mesh, el cual tiene una abertura de 0,038 mm y un diámetro de 0,035 mm.

Los residuos de suelo y quistes recogidos en el tamiz de 100 mesh fueron transferidos a un balón aforado de 250 ml y llenado hasta la mitad con agua. Se agitó y se mezcló la muestra, después se llenó el balón por completo con agua. Se dejó

en reposo durante un minuto para que los quistes flotaran y el resto de materia orgánica precipitara. Posteriormente, se vaciaron los quistes sobre un papel filtro colocado previamente en el embudo de manera que mientras se rotó el balón, el material orgánico no pasara al filtro. La muestra se secó a temperatura ambiente entre los 24 y 25 °C. Posteriormente, se extrajeron los quistes para su conteo y análisis.

Prueba de viabilidad

Con los quistes extraídos, se les realizó la prueba de viabilidad, que consistió en obtener el promedio de huevos y larvas por quiste. Este se efectuó tomando 25 quistes, triturándolos con un homogenizador. Luego se disolvió en un volumen de agua de 50 cc, posteriormente, con una pipeta se tomaron 3 cc para obtener el promedio de huevos y larvas por quiste mediante cálculo matemático, como se indica en la siguiente fórmula para viabilidad de quistes:

$$VT = \frac{\text{Pro. } 3\text{cc} \times \text{Vol. H}_2\text{O}}{Q}$$

Dónde:

VT= Viabilidad Total

Pro= Promedio de 3 alícuotas

Q= Número de quistes

La identificación de hongos y bacterias de suelo, se utilizó los medios de PDA, AN, TZC, BDK, CPG y AA.

VARIABLES A EVALUAR

- Población inicial y final de quistes en 250 g de suelo seco.
- Viabilidad de larvas y huevos/g/quiste y larvas y huevos/g/suelo seco.
- Temperatura sobre plástico y a 15 cm de profundidad del suelo.
- Poblaciones de microorganismos de suelo (microbiología), inicial y final.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El Cuadro 1 y la Figura 3, presentan las temperaturas promedio de cada mes. Sobre el plástico a 15 cm de profundidad, destacó, que los meses de mayor temperatura fueron febrero, marzo, abril y mayo, para un promedio de 39,20 y de menor número fueron: junio, julio, agosto, setiembre y octubre, con promedio de 19,09 °C.

Cuadro 1. Datos de temperatura (°C) sobre polietileno tricapa y a 15 cm de profundidad de suelo. San Juan de Chicué. Cartago. 2018.

	Temperatura promedio mensual sobre plástico	Temperatura promedio a 15 cm profundidad de suelo
Febrero	37,76	18,53
Marzo	41,64	23,01
Abril	41,97	23,92
Mayo	35,45	19,38
Junio	30,19	18,82
Julio	25,61	17,61
Agosto	24,27	17,38
Setiembre	28,77	20,32
Octubre	31,88	21,32
Promedio	39,205	19,09

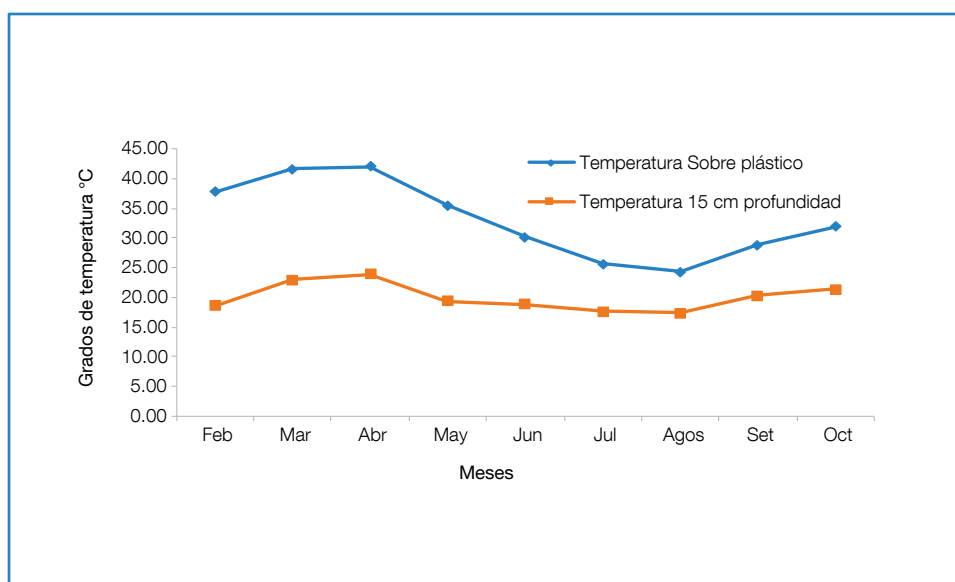


Figura 3. Promedio mensual de temperatura sobre el plástico y 15 cm de profundidad el suelo solarizado. Datos tomados en durante horas de 10:30 a.m. a 3:30 p.m. durante nueve meses. San Juan de Chicué. Cartago, 2018.

Los Cuadros 2, 3 y la Figura 6 presentan durante los muestreos ejecutados en ambas parcelas con y sin plástico, durante el período comprendido entre febrero y octubre 2018. Los resultados de las medias de los tratamientos en la variable larvas y huevos/g de suelo seco indicaron que el muestreo inicial en la parcela con polietileno presentó una población de larvas y huevos/g de suelo seco de 93,00, el muestreo final concluyó con 12,49. Lo anterior muestra que el efecto de la solarización disminuyó la plaga por debajo del umbral de daño establecido (13 larvas y huevos/g de suelo) con un porcentaje de 87% menos en las poblaciones. Por el contrario, la parcela sin plástico inició con 94,00 y finalizó con 130,25.

Cuadro 2. Poblaciones de quistes y viabilidad durante los muestreos ejecutados en ambas parcelas con y sin plástico. San Juan de Chicué. Cartago. 2018

Meses de muestreo	Parcelas	Total Quistes	Larvas y huevos/quiste	Total larvas y huevos	L/h/g suelo seco
Febrero	1-Con plástico	186	125	23,250	93,00
	2-Sin Plástico	188	125	23,500	94,00
Abril	1-Con plástico	288	50	14,400	53,33
	2-Sin Plástico	260	162,5	68,250	252,78
Julio	1-Con plástico	110	35,42	3.896	16,79
	2-Sin Plástico	220	114,58	25.207	109,59
Octubre	1-Con plástico	187	17,5	3,272	12,49
	2-Sin Plástico	350	97,5	34,125	130,25

En el Cuadro 3, La prueba de t-Student presentó diferencias estadísticas entre las variables larvas y huevos/quiste y larvas y huevos/g de suelo seco, estas son quizá las variables más importantes de la investigación y en general para esta plaga.

Cuadro 3. Medias en la prueba de t-Student en parcelas con plástico y sin plástico.. Cartago, San Juan de Chicuá. Costa Rica. 2018.

Variables	Con plástico	Sin plástico	Probabilidad P=valor	Prueba
Total de quistes	192,75	254,50	0,2684	bilateral
Larvas y huevos/quiste	56,98	124,90	0,0475*	bilateral
Total Larvas y huevos	11,20	37,77	0,0596	bilateral
Larvas y huevos/g de suelo seco	43,90	146,66	0,0451*	bilateral

*Valores menores (<) al 0.05% tienen significancia según prueba T de student.

En la Figura 4, se observan las dos parcelas con polietilenotricapa y sin plástico. En la parcela solarizada hubo una eliminación de plantas arvenses, una reducción muy importante del aporco o remanentes del cultivo de papa.

Entre los aspectos relevantes, la parcela con polietilenotricapa obtuvo una disminución de poblaciones considerable en todas las variables en los diferentes muestreos. En la parcela sin plástico, en algunos meses disminuyeron las poblaciones; lo anterior debido que, los nematodos como *Globodera* sp. (aunque no tengan hospedero), siempre eclosionan respondiendo a los cambios de temperatura y humedad. Sumado a esto, los exudados radicales de las arvenses (aunque estas no son hospederos como la papa), pueden disminuir sus poblaciones. Sin embargo, las poblaciones se incrementan cuando brotan los remanentes de los tubérculos y reinician su ciclo de vida. Lo anterior ocurrió en el tratamiento sin plástico, aun así, sus poblaciones fueron siempre altas (figura 4 B).



Figura 4. (A) Parcelas con polietilenotricapa. (B) Parcelas sin plástico al final del último muestreo. San Juan de Chicuá, Cartago, Costa Rica, 2018.

El Cuadro 4, presenta los resultados del análisis microbiológico de suelo, con respecto al muestreo inicial. Se observó la presencia en ambas parcelas de los hongos fitopatógenos *Pythium* sp. y *Fusarium* sp. No se observaron bacterias fitopatógenas. Los demás hongos identificados se consideran saprófitos y no afectan a los cultivos agrícolas.

Cuadro 4. Muestreo inicial de microbiología de suelos en parcelas con polietileno-tricapa y sin plástico. San Juan de Chicué Cartago, Costa Rica. 2018.

Descripción de la muestra	Hongos positivos en el medio de cultivo	Bacterias
Suelo con plástico	<i>Pythium</i> , <i>Fusarium</i> sp. <i>Mucor</i> sp., <i>Syncephalastrum</i> sp.	Crecimiento negativo de bacterias fitopatógenas.
Suelo sin plástico	<i>Pythium</i> sp., <i>Trichoderma</i> sp. <i>Mucor</i> sp., <i>Syncephalastrum</i> sp.	Crecimiento negativo de bacterias fitopatógenas.

El Cuadro 5, presenta el análisis microbiológico de suelo finalizada la investigación. Indica que, en el suelo con polietileno-tricapa prevalece del hongo patógeno *Fusarium* sp. Es posible que la temperatura máxima que alcanzó este tratamiento no afectara este microorganismo. Resaltó que no hubo un crecimiento de bacterias fitopatógenas en la muestra del suelo.

Para el caso del tratamiento sin plástico, los hongos fitopatógenos encontrados fueron: *Phytophthora* sp., y *Pythium* sp., además, del crecimiento de bacterias *Ralstonia solanacearum* y *Pseudomonas* sp., estos últimos microorganismos afectan al cultivo de papa y son de importancia por el daño que produce en la reducción de los tubérculos y pudriciones de los mismos, lo cual incide en su rendimiento.

Cuadro 5. Muestreo final de microbiología de suelos en parcelas con y sin plástico. San Juan de Chicué Cartago, Costa Rica. 2018.

Descripción de la muestra	Hongos positivos en el medio de cultivo	Bacterias
Suelo con plástico	<i>Geotrichum</i> sp. <i>Fusarium</i> sp. <i>Mucor</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp.	Crecimiento negativo de bacterias fitopatógenas
Suelo sin plástico	<i>Phytophthora</i> sp., <i>Pythium</i> sp. <i>Mucor</i> sp., <i>Syncephalastrum</i> sp.	Crecimiento positivo de Bacterias patógenas: <i>Ralstonia solanacearum</i> y <i>Pseudomonas</i> sp.

Durante esta investigación, las temperaturas máximas promedio por mes, entre las 10:30 a.m. y 3:30 p.m., alcanzaron rangos mayores a los 35°C. Hubo una reducción de la plaga en la parcela solarizada con polietileno-tricapa. El muestreo inicial en esta parcela con plástico evidenció una población de 93 larvas y huevos/g de suelo seco y finalizó con 12,49. El efecto de la solarización disminuyó la plaga por debajo del umbral de daño establecido (13 larvas y huevos/g de suelo) con un 87% de reducción de las poblaciones. En el caso del tratamiento sin plástico, inició con 94 larvas y huevos/g de suelo seco y terminó con 130,25. También la parcela solarizada con polietileno-tricapa eliminó

los hongos patógenos *Pythium* sp. y *Erwinia* sp., los cuales afectan el rendimiento del cultivo de papa, por otro lado, hubo un efecto total sobre las arvenses y eliminación parcial sobre el aporco como remanente de siembras anteriores de papa.

Según FAO (1995), el uso de la solarización por parte de los agricultores es sumamente bajo, la mayoría de los técnicos y agricultores solo tienen conocimiento parcial o no de la técnica. Aquellos que han usado la solarización manifiestan que es una alternativa importante y que da buenos resultados, pero señalan algunas limitaciones, como el alto costo del plástico, el tiempo de espera y en

algunos casos la efectividad errática en el control de malezas como *C. rotundus* y los nematodos. Por otra parte, en Costa Rica, como en muchas otras partes del mundo, la solarización o calentamiento del suelo por irradiación solar mediante el empleo de coberturas plásticas, se ha considerado una alternativa no química importante en el control de malezas y patógenos, especialmente en almácigos. Esporádicamente la solarización se ha utilizado también en cultivos de alta rentabilidad, en los que por alguna razón no se desea aplicar plaguicidas.

En esta investigación, los meses de mayor temperatura, sobre el plástico, fueron febrero, marzo, abril y mayo, con un promedio de 39,20 °C y los de menor temperatura fueron junio, julio, agosto y octubre para un promedio de 19,09°C. En la prueba estadística hubo diferencias significativas al 0.05% entre las variables: total de larvas y huevos/quiste y la cantidad de larvas y huevos/g de suelo seco. Lo anterior fue menor a la parcela con plástico. Con la parcela solarizada se determinó la eliminación de plantas arvenses y parcialmente de residuos del cultivo de papa. También y de acuerdo con FAO (1995), el sistema de solarización con cobertura húmeda ayuda tener un mejor efecto sobre la plaga y las malezas del suelo; por tanto, en esta localidad donde se ejecutó la investigación los suelos son muy húmedos y esto ayudó a subir temperatura en la época seca para un mejor control de la plaga en estudio.

El análisis microbiológico de la parcela solarizada con polietileno-tricapa mostró un efecto de eliminación del microorganismo patógeno *Pythium* sp., que puede afectar el rendimiento del cultivo de papa. Para el caso del tratamiento sin plástico, los hongos fitopatógenos encontrados, al inicio y al final, fueron: *Phytophthora* sp., y *Pythium* sp. y las bacterias fitopatógenas *Ralstonia solanacearum* y *Pseudomonas* sp. Estos microorganismos, en algunos casos, influyen en el rendimiento y

podrición de tubérculos. Según Arboleya *et al.*, 2006, algunos organismos de suelo soportan temperaturas muy cercanas a los 37 °C. Lo anterior, refuerza el efecto que tuvo el plástico polietileno-tricapa sobre *Globodera* si, porque, la máxima temperatura llegó cerca a los 40°C. De igual manera Stapleton *et al.*, 2000, manifiestan que esta técnica se puede utilizar en varios cultivos o explotaciones agropecuarias y como ejemplo esta técnica se puede utilizar en almácigos de cebolla para el control de patógenos de suelo. De acuerdo con Katan y DeVay (1991) la solarización es una buena alternativa que da buenos resultados, pero hay algunas limitaciones: el alto costo del plástico, tiempo de espera y en particular este caso la topografía de los terrenos para poder tener cobertura del suelo es muy difícil. Las investigaciones con esta técnica han sido dirigidas principalmente al control de algunos patógenos y arvenses en varios cultivos en almácigos. En Costa Rica y en especial la zona norte de la provincia de Cartago la mayoría de los productores dejan residuos de papa y esto hace que se sigan reproduciendo plagas con el nematodo *Globodera* spp.

En general, la variable viabilidad de larvas y huevos/g de suelo seco presentó una eficacia de un 87% en la parcela polietileno-tricapa al obtener una población inicial de 93,00 larvas y huevos/g de suelo seco y la finalizar con 12,49. De acuerdo con Davis (1991), la solarización puede controlar gran variedad de microorganismos como: *Pythium ultimum*, *Pythium* spp., *Verticillium albo-atrum*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotium cepivorum*; entre los nematodos *Ditylenchus dipsacii*, *Meloidogyne javanica* y otras malezas o arvenses. Lo anterior, le da validez a los resultados, al demostrarse un control de *Pythium* sp y un efecto sobre la viabilidad de quistes de *Globodera* spp. Esta técnica es una opción o alternativa en áreas pequeñas y planas para obtener semilla básica de papa y también servir, en solarizar áreas para semillero como la cebolla.

LITERATURA CITADA

- Avilés, J; Piedra, R. 2016. Manual del cultivo de papa en Costa Rica. p.98.
- Bernal, R; Mendo, Y; Orihuela, C. 2005. Alternativas al Bromuro de Metilo en Zonas de Salto y Bella Unión - Informe Final 2004. INIA Salto Grande. Ad 399.
- Bello, A. 1998. Biofumigation and integrated pest management. In: A. Bello; J. A. González; M. Arias; R. Rodríguez-Kábana (Eds). Alternatives to Methyl Bromide for the Southern European Countries. Phytoma España, DG XI EU, CSIC, Valencia, Spain, 99-126.
- Crozzoli, PR. 1994. Temas de nematología Agrícola I. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, Comisión de información. p. 8-9.
- Hernández, J.C. 2013. Edafología y Fertilidad. Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Valencia, España. 205 p. Extraído de <https://www.intagri.com/articulos/fitosanidad/desinfeccion-del-suelo-por-solarizacion> - Esta información es propiedad intelectual de INTAGRI S.C.
- Davis, J. R. 1991. Soil solarization pathogen and disease control and increases in crop yield and quality: short- and long-term effects and integrated control. In: Katan, J. De Vay J. E. (Eds). Soil Solarization. CRC Press, Boca Raton, FL pp 39-50.
- Espinoza, LD. 2014. La papa en la seguridad alimentaria (I) (en línea). El Economista, Ciudad de México, México. 15 dic. Disponible en <http://eleconomista.com.mx/columnas/agro-negocios/2014/12/15/papa-seguridad-alimentaria-i>.
- Fenwick, DW. 1940. Methods for recovery and counting of cyst *Heterodera* Sachtii from soil. Journal of Helminthology 18:155-172.
- FAO (Organización de la Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2005. Departamento Agricultura y Protección al consumidor. Enfoques Pp. 1-2, 21.
- Franco, J. 1986. Nematodo del quiste de la papa. Boletín de Información Técnica 9. CIP (Centro Internacional de la Papa). Lima, Perú. p. 5- 15.
- Horiuchi, S. 1991. Soil solarization in Japan. En: Soil Solarization. Eds. Katan J. and DeVay J.E. pag.215-225.
- Luc, M; R; Bridge, J. 2005 Plan Parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. 2 ed. Wallingford, UK. CAB international. P 877.
- Katan, J. and DeVay, J. E. 1991. Soil Solarization: historical perspectives, principles and uses. In: Soil Solarization. CRC press. Pp. 23-37.
- Oostenbrink, M. 1950. Het aardappelaaltje (*Heterodera rostochiensis* Wollenweber) een gevaarlijke parasiet voor de eenzijdige sardappelcultuur. Versl. Meded. plziektenk. Dienst. Wageningen Pp 115: 230.
- Stapleton, J. J; Elmore, C. L and DeVay, J. E. 2000. Solarization and biofumigation help disinfect soil. CALIFORNIA AGRICULTURE, Volume 54, N° 6 pag. 42-45
- Arboleya, J; Campelo, E. y Rodríguez, J. 2006. Solarización de canteros para almacigos de cebolla. Revista INIA N°8 pp. 21- 24.
- Skantar, AM; Handoo, ZA; Zasada, IA; Ingham, RE; Carta, LK; Chitwood, DJ. 2011. Morphological and molecular characterization of *Globodera* populations from Oregon and Idaho. Phytopathology: 101:480-491.

INSECTOS PORTADORES DEL FITOPLASMA ASOCIADO A LA ENFERMEDAD CUERO DE SAPO EN EL CULTIVO DE YUCA¹

Yannery Gómez-Bonilla²

RESUMEN

Insectos portadores del fitoplasma asociado a la enfermedad de cuero de sapo en cultivo de yuca. La yuca es un cultivo de gran importancia para el pequeño y mediano productor de trópico húmedo costarricense. El fitoplasma 16SrIII-L se ha asociado con la enfermedad de Cuero de Sapo (CS) está considerada como una de las enfermedades más limitantes para el cultivo de yuca, provocando pérdidas en el rendimiento del cultivo en más de un 90%. El objetivo de esta investigación fue identificar los insectos portadores del fitoplasma en las principales áreas donde se cultiva yuca en el país. Este estudio se enfocó en el muestreo de insectos asociados al cultivo de yuca. Hubo una captura de 725 insectos, en la cual se identificaron 20 géneros de la familia Cicadellidae entre los años 2017-2018. Las especies más abundantes de cada uno de los sitios visitados fueron *Hortensia similis* en un 30% y *Macunola ventralis* con un 22%, *Agallia instabilis*, fue encontrada en un 19%, *Acusoma sp.* y *Sibovia sp.* que no se encontraron en tres sitios, pero se contabilizaron en un 14% y 8% respectivamente, entre la región Huetar Norte y Caribe. Algunas de estas especies dieron positivo como portadoras del fitoplasmas, lo cual pone en evidencia la necesidad de tener un buen manejo de estas especies, ya que podrían llegar a ser posibles vectores de la enfermedad. Las especies positivas a la presencia del fitoplasma fueron *Hortensia similis*, *Macunola ventralis*, *Agallia instabilis*, *Acusoma sp.*, *Agrosoma bisperella*, *Tylozygus fasciatus*, *Sterellus bicolor* y *Silovie sp.*, así como algunas de las raíces muestreadas.

Palabras clave: Cuero de sapo en yuca, fitoplasma, Cicadellidae.

Keywords: Cassava frogskin disease, phytoplasma, Cicadellidae.

1 Proyecto financiado por FITTACORI. Fundación para el Fomento y Promoción de la Investigación y Transferencia de Tecnología Agropecuaria de Costa Rica.

2 Yannery Gómez-Bonilla, PH. D. INTA. Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria, INTA. Costa Rica. ygomez@inta.go.cr; yangomez27@yahoo.com. Sede del Laboratorio de Servicios de Fitoprotección del INTA. Sabana Sur, San José.

INTRODUCCIÓN

La yuca constituye un alimento básico en la dieta de 17.8 millones de personas en el mundo (FAOSTAT 2010) además de ser un cultivo industrial con alto potencial, genera ingresos permanentes para pequeños y medianos agricultores y aporta al desarrollo social de las regiones donde se cultiva. El Cuero de Sapo (CS) es considerado como una de las enfermedades más limitantes para el cultivo de yuca, puesto que afecta directamente la producción de raíces, provocando pérdidas en el rendimiento del cultivo del 90% o más (Pineda 1983; Calvert y Cuervo 2002). Estos problemas se presentan debido al poco conocimiento que se tiene sobre la etiología de la enfermedad, por consiguiente, de metodologías eficaces para la detección de los posibles patógenos involucrados y de la selección de materiales libres de la enfermedad en campo o invernadero.

Las raíces de las plantas enfermas son leñosas, de cáscara gruesa, corchosa y quebradiza, las cuales presentan unas hendiduras en forma de labios, que unidas entre sí, semejan una red o panal. Las raíces pueden ser muy delgadas, aunque no siempre, el grosor del tocón y los tallos pueden ser muy gruesos. El aumento del grosor en los tallos está relacionado con la falta de acumulación del almidón en las raíces, los cuales por presentar un diámetro grueso y pueden ser seleccionados erróneamente por el agricultor para reproducir semillas vegetativas. En plantas severamente afectadas (45 a 60 días después de sembradas) se pueden observar lesiones longitudinales características en forma de labio, localizadas en las raíces. Los síntomas de la enfermedad pueden manifestarse en todo el sistema radical, en algunas raíces o sólo en una parte de la raíz afectada, por lo que las lesiones características se encuentran en la base de la raíz, en su parte media, o en su parte apical (Álvarez *et al.* 2010, 2009).

En cuanto al agente causal de esta enfermedad, se le ha asociado a un fitoplasma (16SRIIIL), encontrado en Costa Rica y reportado por (Pardo *et al.* 2015). Los fitoplasmas son bacterias sin pared celular, pleomórficos, con un genoma muy pequeño (680-1600 Kb) y son transmitidos por insectos que causan numerosas enfermedades de importancia económica y ecológica

a especies de plantas en todo el mundo (Lee *et al.* 2000; Álvarez, *et al.* 2009). Por lo general los fitoplasmas se ubican en el floema de plantas infectadas y en la hemolinfa de insectos vectores (Contaldo *et al.* 2012). La lista de enfermedades causadas por fitoplasmas (que en un principio fueron atribuidas a virus) han ido en aumento y son consideradas de valor ya que producen enfermedades en muchas especies de importancia económica (Arismendi *et al.* 2010).

Los fitoplasmas son transferido entre plantas por insectos chupadores de savia del floema vectores de diferentes familias incluyendo Psyllidae, Cicadellidae y Cixidae, en los que se reproducen (Lee y Davis, 1992). La familia Cicadellidae, la cual pertenece al orden Hemiptera, suborden Auchenorrhyncha; se divide en dos tribus Cicadellini y Proconiini (Nielson 1979). Muchos de sus miembros se alimentan de áreas de cultivos o plantas asociadas a los mismos (arvenses), son pocos los casos en los que causan problemas directos en las regiones tropicales (Saunders *et al.* 1998).

De acuerdo con Hill (1994), estos insectos tienen tamaños variados que van desde 2 a 3 mm hasta los 14 mm en algunas especies. Una de las principales características de este grupo es que presentan una línea doble de espinas a lo largo del borde exterior de la tibia posterior. Godoy *et al.* (2006) advierte que la alimentación de estos insectos se basa principalmente de la savia de las hojas y tallos de plantas, aunque reconoce que pueden tener múltiples hospederos; agrega que su mecanismo de ingreso a las plantas es por medio del estilete (una modificación de sus partes bucales chupadoras), al hacerlo se pone en funcionamiento un músculo que bombea grandes cantidades de savia de la cual extraen su alimento y energía. Las especies que se alimentan de savia del floema excretan un líquido azucarado y las que se alimentan de la savia de la xilema excretan grandes cantidades de agua (Brodbeck *et al.* 1995; Redak *et al.* 2004).

Se consideran como plaga debido a que pueden actuar como vectores de patógenos (virus, bacterias, protozoarios). Indican (Alma *et al.* 2019), que la epidemiología de las enfermedades

asociadas al fitoplasma es una consecuencia de la capacidad de los vectores en la adquisición, inoculación, dispersión, supervivencia, rango del huésped y colonización del hábitat. Dentro de la misma especie vectorial, la eficiencia de adquisición puede depender de la carga de fitoplasma en las plantas de origen y del estadio de vida de los vectores (ninfas *versus* adultos). En esta primera fase de la investigación, se pretende identificar los insectos portadores del fitoplasma,

posteriormente, se espera contar con el medio artificial donde se pueda reproducir el fitoplasma, y determinar cuáles de estos insectos son vectores y transmisores de la enfermedad.

El objetivo de esta investigación fue identificar insectos portadores del fitoplasma asociado a la enfermedad conocida como “Cuero de Sapo” en yuca.

MATERIALES Y MÉTODOS

Identificar los insectos portadores del fitoplasma en los lugares donde se cultiva yuca

Muestreo de insectos y raíces

Durante los años 2017 y 2018, se realizaron muestreos en diferentes fincas, en al menos dos fincas de las principales zonas yuqueras del país: Guatuso (mayo), Sarapiquí (junio), Upala (julio), Pital (setiembre), Venecia (octubre), Cutris (noviembre) todos estos en el año 2017 y Fortuna (marzo), La Tigra (abril), Los Chiles (mayo), Cariari (junio), Santa Clara (julio) en el año 2018. Esta actividad fue continuación del trabajo iniciado en el año 2014 (Álvarez *et al* 2015), en donde se identificaron tres especies de posibles vectores portadores del fitoplasma 16SrIII-L. Los muestreos fueron realizados en horas de la mañana entre las 7am -12 m., el recorrido fue realizado en una ha de terreno alrededor del cultivo de yuca, en donde se caminaba pasando la red cerca de las arvenses en forma de zigzag. En cada una de las fincas se capturaron insectos y se seleccionaron los adultos de la Familia Cicadellidae, se capturaron cientos de ninfas, las cuales no fueron identificadas ni analizadas, se separaron por especie, género o familia y se guardaron en grupo por finca en tubos de reacción de 2 ml para ser preservados

en refrigeración a -20 Celsius para su posterior análisis molecular, en el cuadro 1 se muestra los insectos capturados e identificados. Los insectos capturados y que no se pudieron identificar fueron refrigerados y no se les hizo el análisis molecular. De cada grupo de insectos se preservó uno (si solo habían dos capturados, si había más se guardan al menos dos insectos) en alcohol de 70% para su posterior identificación taxonómica por medio de claves taxonómicas Knight (2010) y Maes & Godoy (1993).

Los insectos capturados con la red entomológica, fueron colocados en una bolsa plástica y se introdujeron en una hielera a una temperatura de entre 4-8 °C, para que los insectos se mantuvieran quietos y evitar el daño entre ellos. Los sitios de muestreo fueron georeferenciados y visitados una única vez durante todo el periodo del muestreo. En algunas de las fincas fueron tomados muestras de raíces de yuca sin y con síntomas aparentes de la enfermedad, se colocaron en una bolsa plástica dentro de una hielera y posteriormente se mantuvieron a 4 °C hasta su análisis molecular.

Análisis moleculares

Preparación de las muestras

Cada raíz de yuca se lavó con abundante agua de tubo y se cortó en dos o tres pedazos, se partió transversalmente a la mitad y se raspó la parte central de la yuca con la ayuda de un bisturí, el raspado fue depositado en un mortero estéril, se le agregó nitrógeno líquido y se maceró con el pistilo. Para la extracción del ADN y análisis moleculares, se tomaron dos muestras de 1 ml en un tubo de reacción de 1,5 ml. Los insectos se coloraron todos los que habían de cada especie, por finca, dentro del tubo de reacción de 2 ml, se les agregó nitrógeno líquido y se maceraron con el pistilo. Para la extracción del ADN y análisis de muestras moleculares, igualmente se tomaron dos muestras de 1 ml en un tubo de reacción de 1,5 ml.

Procedimiento para la Extracción de ADN e identificación de fitoplasma según protocolo de Álvarez *et al.* 2010.

Procedimiento para extracción de ADN

Se preparó el buffer de extracción, mezclando: 0,4 ml de EDTA 0.5 M, 0,4 ml de NaCl 5M y 3,096 ml de H₂O destilada estéril. Este buffer se guardó a 4 °C hasta su uso. A las muestras preparadas, se le adicionó 510 µL de buffer de extracción y 4µL de β-mercapto 14,4 M, el cual debe ser preparado en el momento de la extracción. Se agitó la solución en un vórtex por dos minutos y luego se le adicionó 90 µL de SDS (dodecil sulfato sódico) al 10% y se agitó en vórtex por dos minutos más. Seguidamente, se incubó a 65°C por 10 minutos. Luego se adicionó 150µL de acetato de potasio (pH 5,5) y se invirtió el tubo de reacción hasta homogenizar la muestra y se dejó en hielo por 10 minutos. Pasado ese tiempo, se centrifugó a 14.000 r.p.m por 10 minutos a 4 °C. Se recogió el sobrenadante (+/- 600 µL) y se adicionó 0,5 volúmenes de isopropanol 100% (frío). Se centrifugó a 14.000 rpm por 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet con 500 µL de etanol 70%. Se centrifugó a 10.000 rpm por cinco minutos. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente. Se re suspendió en 100 ul agua o buffer TE y se refrigeró a -20°C hasta su uso.

Análisis por PCR anidado

Se empleó la técnica de PCR anidado, se preparó una mezcla de 12,5 µL de go taq master mix 2X Promega, 0,5 µL de cada cebador, 9,5 µL de agua y 2 µL de cada muestra de medio líquido, para un volumen final de 25 µL.

Para la primera PCR, se utilizaron los cebadores universales P1/Tint (Smart *et al.* 1996), los cuales amplifican un fragmento de 1600 pares de bases, ubicado en la región 16S rDNA y parte del 23S rDNA y para la segunda PCR (PCR 2), los cebadores R16F2n/ R16R2 (Lee *et al.* 1993; Gundersen *et al.* 1996) que generan un amplicón de 1200 pares de bases, correspondiente a la región parcial del 16S.

El perfil de amplificación fue: desnaturalización inicial a 94°C por un minuto y 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por un minuto, alineación 50°C durante dos minutos y extensión a 72 °C por tres minutos, seguido de una extensión final a la misma temperatura por 10 minutos.

Para la segunda PCR se tomó 1 µL del amplificado y se diluyó en 29 µL de agua. Además, se utilizaron 2 µL de cada cebador R16F2N/ R16R2, ajustando con agua a un volumen final de 25 µL y las mismas condiciones de temperatura de la PCR 1.

La tercera PCR específica para fitoplasmas del grupo III, se realizó tomando un µL del producto amplificado de la segunda PCR y se diluyó en 29 µL de agua. Posteriormente se utilizaron 2 µL de los cebadores R16 (III) F2/R16 (III) R1 (Lee *et al.* 1994), que amplifican un fragmento de 800 pb del gen 16Sr. El perfil de amplificación únicamente cambió en la primera desnaturalización que fue de dos minutos a 94°C.

Como control positivo de los experimentos, se utilizó un tejido infectado de plantas de yuca, proporcionados por el CIAT, se utilizó un solo control negativo (agua para análisis molecular) y dos muestras de cada una de las fincas, tanto con síntomas y sin síntomas de la enfermedad.

Electroforesis

Se usaron 7 μ L del producto de amplificación para cargarlos en un gel de agarosa al 1%, teñido con SYBR safe (invitrogen) 4 μ L/200cc y se corrieron en electroforesis a 100 V por 140 minutos. Al finalizar la corrida se verificó con transiluminador y se hizo registro fotográfico (Sambrook *et al.* 1989)

Análisis por PCR en tiempo real (qPCR)

Además de los PCR anidados, se utilizó otro método de identificación mediante PCR en tiempo real, siguiendo la metodología descrita por Álvarez y Pardo (2013). La sonda y cebadores están basados en el gen 16Sr dentro de una región de 1400 pares de bases que codifica para proteínas de la subunidad 16S. Esta región es altamente conservada, presenta polimorfismos entre grupos de fitoplasmas y tiene dos copias en el genoma de cada célula bacteriana (Torres *et al.* 2005), logrando mayor sensibilidad.

La sonda se encuentra en la posición 469 y los cebadores en 416 (sentido) y 492 (antisentido), logrando amplificar un fragmento de 72 pares de bases. Se trabajó a una concentración de 200 nM para la sonda y los cebadores. Para las amplificaciones de una región del gen *rp* asociada con el fitoplasma, se utilizaron placa óptica de 96 pozos en un termociclador, con un perfil de amplificación de estándar Fast Two Step que consiste un ciclo a 95°C por 10 minutos, un ciclo de 95°C por 30 segundos y 40 ciclos 60°C por un minuto. Para la amplificación de ADN del fitoplasma 16SrIII-L se utilizó un volumen de 12 μ l por reacción compuesto de 3 μ l de ADN, 6.25 μ l de SYBR Green Master Mix (Promega), 0.5 μ l de Sonda rplII-, 0.75 μ l de cebador rplII-PF, 0.75 μ l de cebador rplIIPR y 0.75 μ l de H_2O molecular. Este análisis fue utilizado solo en los dos primeros lotes, se envió a comprar más, pero el equipo se desconfiguro y no se pudo utilizar más para efectos de este trabajo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificar los insectos portadores del fitoplasma en los lugares donde se cultiva yuca

Hubo una captura de 725 insectos (cuadro 1), de los cuales más 600 fueron de la familia Cicadellidae y fue a esta familia que se le dio prioridad para su identificación. Con la ayuda de las guías taxonómicas, se logró identificar algunos individuos hasta especie, otros insectos se identificaron hasta subfamilia y muchos no se pudieron identificar (figura 1), se presentan las especies capturadas y los lugares donde fueron capturados. Esta es la familia más grande del Suborden Auchenorrhyncha y sus especies diseminadas en áreas templadas y tropicales del mundo (Knight 2010). Estos insectos también conocidos como chicharritas pertenecen a una de las familias más diversas y se estiman 22000 especies distribuidas en todas las regiones biogeográficas. La importancia fitosanitaria de los cicadélidos radica en la transmisión, dispersión y como reservorios de

patógenos como los fitoplasmas, que causan enfermedades en un amplio rango de plantas hospederas (Blanco Rodríguez 2014).

En el cuadro 1, se muestran las especies más abundantes de cada una de los sitios visitados, por ejemplo, *Hortensia similis* y *Macunola ventralis*, fueron las dos especies presentes en todos los lugares muestreados. *H. similis* fue capturado en un 30% de los sitios, Blanco (2014), reporta un 49% de captura en el país. En el caso de *M. ventralis* fue la segunda de mayor captura con un 22%. *Agallia instabilis* se capturó en todos, excepto en Cutris, con una abundancia total del 19%. Luego, en el caso de *Acusoma* sp. y *Sibovia* sp. se encontraron en ocho de los once cantones muestreados, con una abundancia de 14% y 8 % respectivamente.

Cuadro 1. Insectos capturados en las zonas de estudio. Los encontrados como portadores del fitoplasma se marcaron como (+).2016-2017

	Guatuso	Sarapiquí	Upala	Pital	Venecia	Cutris	Fortuna	La Tigra	Los Chiles	Cariari	Santa Clara	% Presente
<i>Hortensia similis</i> (+)	18	4	47	9	9	4	7	19	28	14	25	100
<i>Agallia instabilis</i> (+)	9	3	11	5	4		3	7	8	3	9	90
<i>Macunola ventralis</i> (+)	5	2	4	2	8	7	5	4	9	9	4	100
<i>Tylygus fascilis</i> (+)	7	1	9							5	5	46
<i>Gyponana</i> sp.	3											9
<i>Acusoma</i> sp (+)	4	3		5			7	5	14	5	7	73
<i>Planicephala flaviacosta</i>	4	2										9
<i>Balclutha</i> sp	7	2		2	4	3			6	1		64
<i>Sterellus bicolor</i> (+)	8	4	5							1	5	46
<i>Sibovie</i> sp (+)	5	3		1	5	2		1	9	2	7	73
<i>Agrosama bisperella</i> (+)	5	2	8					7	12	3	2	64
<i>Typhlocybae</i>	3	4		6	4	5			13			64
<i>Draeculocephala</i>	5		14									27
<i>Sindelphax fallas</i>	3	4	2	4	6	4						55
<i>Stictolobus</i> sp	2										8	18
<i>Eucelis</i> sp			1									9
<i>Delphacidae</i>			12							3	11	27
<i>Plesiomnata corniculata</i>		4	2									18
<i>Cyrtoptus suavis</i>		6										9
<i>Comocephala dyeri</i>		2				1	1					27
<i>Sranctonus</i>		2			3							18
<i>Trialeurodes variabilis</i>												9
<i>Graminella</i> sp	2	9									4	36
No identificados	15	6	9	4	3	1	5	3	6	4	6	
Total	105	63	124	38	46	27	28	49	116	51	78	725

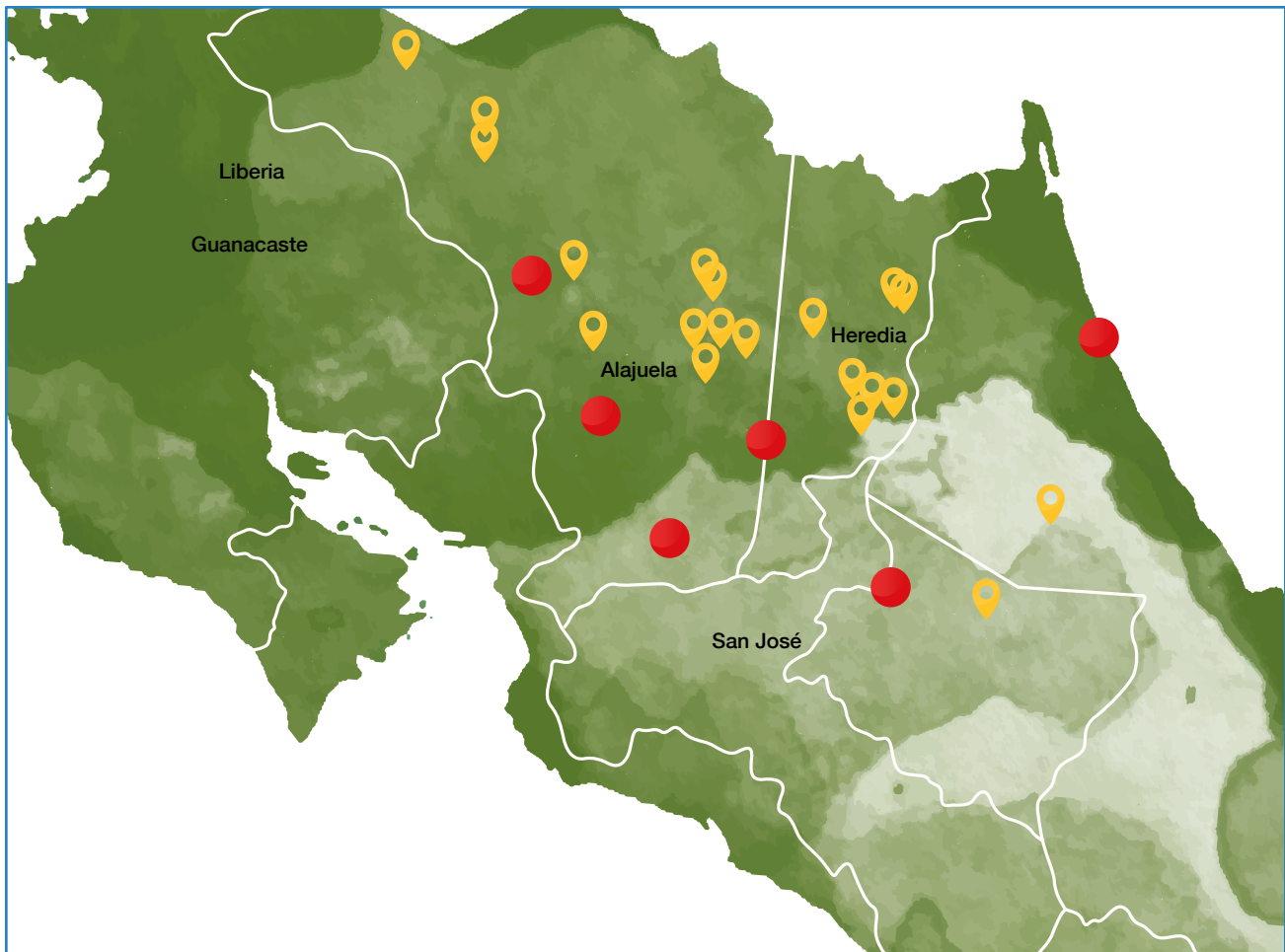


Figura 1. Fincas muestreadas de la región Huetaar Norte, los puntos rojos señalan las fincas donde se encontró raíces con la enfermedad de cuero de sapo. Costa Rica. 2018.

Los muestreos fueron realizados una sola vez, por lo que cabe la posibilidad de que si se dieran más muestreos se puedan encontrar la mayoría de estas especies en todos los yucales. De las especies capturadas se encontraron alguna de ellas positivas como portadoras del fitoplasma (+), señaladas en el cuadro 1 y 2. esto pone en evidencia la necesidad de tener un buen manejo de plagas, ya que las mismas se encontraron en las arvenses de todos estos sitios. Aunque la cantidad de fitoplasma que pueden portar estos insectos es poca, a largo plazo podría ser significativa, ya que poco a poco los yucales se van a ir contaminando, (Bianco *et al* 2019) indica que el uso de plantas huésped resistentes al fitoplasma y de material libre de fitoplasma para

nuevas plantaciones podría representar un punto de partida para el manejo de la enfermedad del fitoplasma, además de la identificación temprana de plantas huésped infectadas e insectos vectores representa herramientas necesarias para prevenir epidemias de enfermedades. En algunos de los lugares muestreados en esta investigación donde se encontraron insectos positivos, coinciden con los reportados en (Pardo *et al* 2015), donde se indica que Costa Rica, el fitoplasma del grupo 16SrIII-L fueron detectados en las localidades de Aguas Zarcas, Pital, Los Lagos, La Merced, Los Chiles, Alajuela, Fortuna y Guápiles y que los síntomas de la enfermedad encontrado en las raíces mostraron una mayor gravedad de la enfermedad.

Análisis moleculares

Se analizaron muestras agrupadas en 12 lotes, los insectos colectados fueron identificados por especie, género o familia (Cuadro 1 y 2). En la mayoría de las fincas se observaron plantas con la enfermedad de cuero de sapo en diferentes grados de severidad y como se observa en este cuadro tres sitios fue donde se encontró mayor cantidad de insectos positivos, como fueron Guatuso, los Chiles y Venecia. En el caso de la especie *H. similis* y *M. ventralis*, se encontró en el 100% de los sitios muestreados, en Guatuso y Venecia dieron positivo, como portadoras del fitoplasma, es un dato importante, porque la enfermedad se puede seguir diseminando por medio de los insectos..

Cuadro 2. Insectos analizados con la técnica de qPCR y PCR, en los diferentes lugares donde se realizó el muestreo.

Sitios	Severidad	No. Insecto/raíz	Q PCR	PCR
Upala	+/2	8 raíces	8/+	2/+
Guatuso	+/4	8 raíces	8/+	8/+
		<i>H. similis</i>	+	+
		<i>T. fasciatus</i>	+	+
		<i>Sterellus bicolor</i>	+	+
		<i>Acusoma sp.</i>	+	+
Guatuso	+/4	8 raíces	8/+	3/+
		<i>H. similis</i>	+	+
		<i>Acusoma sp.</i>	+	+
		<i>M. ventralis</i>	+	+
		<i>Sibovie sp</i>	+	+
		<i>Agrosoma bisperella</i>	+	+
		<i>T. fasciatus</i>	+	+
		Typhlocybinae	+	+
Guatuso	+/4	8/raíces	8/+	3/+
		<i>H. similis</i>	+	+
		<i>Agallia instabilis</i>	+	+
		<i>M. ventralis</i>	+	+
		<i>T. fasciatus</i>	+	+
		<i>Acusoma sp.</i>	+	-
		<i>Gyponana</i>	+	-
		<i>Acusoma sp.</i>	+	+
		<i>Planicephala flaviacosta</i>	+	-
		<i>Balclutha sp</i>	+	+
<i>Sterellus bicolor</i>	+	+		
Los chiles	+/4	8/raíces	NO	5/+
La tигра	+/0 y 4	8/raíces	NO	1/+
La tигра	2	8/raíces	NO	8/-
Los chiles	+/4	8/raíces	NO	8/-
La Fortuna	2	8/raíces	NO	8/-
		<i>Comocephala dyeri</i>	NO	-

Sitios	Severidad	No. Insecto/raíz	Q PCR	PCR
Guatuso	+/4	<i>Agallia instabilis</i>	NO	+
		<i>Graminella sp.</i>	NO	-
		<i>Balclutha sp</i>	NO	+
		<i>Draeculocephala</i>	NO	-
		<i>Stictolobus sp</i>	NO	-
		<i>M. ventralis</i>	NO	-
		<i>Acusoma sp.</i>	NO	-
		<i>Sibovie sp</i>	NO	-
Upala	+/2	<i>Plesiomnata corniculata</i>	NO	-
		<i>H. similis</i>	NO	-
		<i>Acusoma sp.</i>	NO	-
		<i>Stictolobus sp</i>	NO	-
		<i>M. ventralis</i>	NO	-
		<i>T. fasciatus</i>	NO	-
		<i>Draeculocephala</i>	NO	-
		<i>Eucelis sp</i>	NO	-
		<i>Sindelphax fallas</i>	NO	-
<i>Delphacidae</i>	NO	-		
Venecia	+ / 4 y 5	8/raíces	NO	-
Pital	-	8/raíces	NO	-
Venecia	-	8/raíces	NO	-
Venecia	+ /4 y 5	8 /raíces	NO	-
Venecia	+/4	8/raíces	NO	-
Pital	+/3	8/raíces	No	-
Sarapiquí	-	8/raíces	NO	-
		<i>Agallia instabilis</i>	NO	-
		<i>Acusoma sp.</i>	NO	-
Venecia	-	<i>Plesiomnata corniculata</i>	NO	-
		<i>Balclutha sp</i>	NO	-
		<i>M. ventralis</i>	NO	-
		Typhlocybae	NO	-
		<i>Balclutha sp</i>	NO	-
		<i>Agrosoma bisperella</i>	NO	-
		<i>H. similis</i>	NO	-
		<i>M. ventralis</i>	NO	-
		<i>Sibovie sp</i>	NO	-
		<i>Sindelphax fallas</i>	NO	-
		<i>Cyrpoptus suavis</i>	NO	-
		<i>Comocephala dyeri</i>	NO	-
		Pentatomidae	NO	-
<i>Acusoma sp.</i>	NO	-		
Sarapiquí	-	8/raíces	NO	-

Sitios	Severidad	No. Insecto/raíz	Q PCR	PCR
Venecia	+/4	<i>H. similis</i>	NO	-
		<i>Agrosoma bisperella</i>	NO	-
		<i>Sranctonus</i>	NO	-
		Pentatomidae	NO	-
		<i>M. ventralis</i>	NO	-
		<i>Agallia instabilis</i>	NO	-
		<i>Balclutha sp</i>	NO	-
		Typhlocybae	NO	-
		<i>Sibovie sp</i>	NO	-
		Pentatomidae	NO	-
Venecia	+/ 4 y 5	<i>H. similis</i>	NO	+
		<i>M. ventralis</i>	NO	+
		<i>Sindelphax fallas</i>	NO	+
		<i>Comocephala dyeri</i>	NO	+
		<i>Balclutha sp</i>	NO	+
		<i>Graminella sp</i>	NO	+
		Typhlocybae	NO	+
		<i>Sibovie sp</i>	NO	+
La Fortuna	+/2	<i>Draeculocephala</i>	NO	-
		<i>Acusoma sp.</i>	NO	-
		<i>M. ventralis</i>	NO	-
		<i>H. similis</i>	NO	-
		Pentatomidae	NO	-
		<i>Agallia instabilis</i>	NO	-
		<i>Comocephala dyeri</i>	NO	-
Los chiles	+/4	Pentatomidae	NO	-
		Typhlocybae	NO	-
		Typhlocybae	NO	-
La tigre	+/2	<i>Acusoma sp.</i>	NO	-
		<i>Agallia instabilis</i>	NO	-
		Pentatomidae	NO	-
		<i>M. ventralis</i>	NO	-
		<i>H. similis</i>	NO	-
		<i>Graminella sp</i>	-	-
Los chiles	+/4	Pentatomidae	NO	-
		<i>M. ventralis</i>	NO	-
La tigre	+/0 y 4	<i>M. ventralis</i>	NO	-
		<i>Sibovie sp</i>	NO	-
		Pentatomidae	NO	-
		<i>Acusoma sp.</i>	NO	-
		<i>Delphacidae</i>	NO	-
		<i>Agallia instabilis</i>	NO	-
		<i>H. similis</i>	NO	-
		<i>Agrosoma bisperella</i>	NO	-

Sitios	Severidad	No. Insecto/raíz	Q PCR	PCR
Santa Clara	+/4	<i>T. fasciatus</i>	NO	-
		<i>Agrosoma bisperella</i>	NO	-
		<i>Stictolobus sp</i>	NO	-
Sarapiquí	+1	4/raíces	NO	-
Sarapiquí	+8	8/raíces	NO	-
Sarapiquí	+/1	4/raíces	NO	-
		<i>Planicephala flaviacosta</i>	NO	-
Venecia	+ /4 y5	Typhlocybae	NO	-
		<i>H. similis</i>	NO	-
		<i>Sindelphax fallas</i>	NO	-
Venecia	+ / 4 y 5	<i>Balclutha sp</i>	NO	-
		Typhlocybae	NO	-
		<i>H. similis</i>	NO	-
		Pentatomidae	NO	-
		<i>Agallia instabilis</i>	NO	-
Pital	+/3	<i>Sindelphax fallas</i>	NO	-
		<i>M. ventralis</i>	NO	-
		Pentatomidae	NO	-
		Typhlocybae	NO	-
		<i>Balclutha sp</i>	NO	-
		<i>Agallia instabilis</i>	NO	-
		<i>Sibovie sp</i>	NO	-
		Acusoma	NO	-
Guápiles	-	12/plantas In vitro	NO	-
Los chiles	+4	4/raíces	NO	-
Los chiles	+4	4/raíces	NO	-
Guatuso	+2 y 4	8/raíces	NO	-
San Carlos	+4	8/raíces	NO	-
Guatuso	+2	8/raíces	NO	-
San Carlos	+4	8/raíces	NO	-
San Carlos	+/4	8/raíces	NO	-
		8/raíces	NO	-
		8/raíces	NO	-
		8/raíces	NO	-
Cutris	+/4	<i>Comocephala dyeri</i>	NO	-
		<i>H. similis</i>	NO	-
		<i>Balclutha sp</i>	NO	-
		<i>M. ventralis</i>	NO	-
		<i>Sibovie sp</i>	NO	-
		Typhlocybae	NO	-
		<i>Sindelphax fallas</i>	NO	-

Sitios	Severidad	No. Insecto/raíz	Q PCR	PCR
Sarapiquí	+/4	<i>Agallia instabilis</i>	NO	-
		<i>Acusoma sp.</i>	NO	-
		<i>Sranctonus</i>	NO	-
		<i>T. fasciatus</i>	NO	-
		<i>Graminella</i>	NO	-
		<i>Sibovie sp</i>	NO	-
		<i>Balclutha sp</i>	NO	-
		<i>M. ventralis</i>	NO	-
		<i>Plesiomnata corniculata</i>	NO	-
		Pentatomidae	NO	-
		<i>Comocephala dyeri</i>	NO	-
		<i>H. similis</i>	NO	-
Sarapiquí	+/2	<i>T. fasciatus</i>	NO	-
		<i>Graminella</i>	NO	-
		Pentatomidae	NO	-
		Typhlocybae	NO	-
		<i>H. similis</i>	NO	-
Sarapiquí	+/1	<i>Plesiomnata corniculata</i>	NO	-
		<i>Acusoma sp.</i>	NO	-
		<i>Agrosoma bisperella</i>	NO	-
		<i>Sibovie sp</i>	NO	-
		<i>Sterellus bicolor</i>	NO	-
		<i>Acusoma sp.</i>	NO	-
		<i>H. similis</i>	NO	-
		Typhlocybae	NO	-
		<i>M. ventralis</i>	NO	-
		<i>Agrosoma bisperella</i>	NO	-
Sarapiquí	+/1	<i>Acusoma sp.</i>	NO	-
		<i>H. similis</i>	NO	-
		<i>Sibovie sp</i>	NO	-
		<i>M. ventralis</i>	NO	-
Los chiles	5	VALENCIA 12 MUESTRAS	NO	+
		SEÑORITA 14 MUESTRAS	NO	+
		<i>Delphacidae</i>	NO	-

El análisis de PCR en tiempo real, según lo indicado por Álvarez *et al.* (2010), al ser más sensible, puede amplificar hasta 1000 veces más que el PCR convencional, de ahí que la reacción se encuentra en un rango exponencial y puede alcanzar un umbral definido. Se hace la observación que solo en los dos primeros lotes hubo análisis con la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) y es donde se dieron mayor cantidad de positivos y por ende mayor cantidad de especies de cicadellidos portadores del fitoplasma (Cuadro 2), mientras que algunas otras especies fueron negativas. Para estas muestras el umbral fue de Ct 24-35, considerados como positivos, o sea que el fitoplasma está presente, fue el caso de *Hortensia similis*, *Tylozygus fasciatus*, *Macunola ventralis*, *Acrosoma bispinella*, *Silovia sp.*, *Sterellus bicolor*, *Acusama sp.*, *Agallia instalis* (figura 2). Las tres primeras especies (*H. similis*, *T. fasciatus* y *M. ventralis*) coinciden con el informe donde se reportan como positivos y posibles vectores del fitoplasma 16SrIII-L analizados en el CIAT (Álvarez, *et al.* 2015).

Se continuaron los análisis con el PCR anidado, realizando tres etapas del PCR, para determinar la presencia del fitoplasma. La cantidad de fitoplasma en cada uno de los insectos es poca, y por cada PCR se va aumentando la cantidad de fitoplasma presente. Los resultados de los análisis dieron positivo para las especies portadoras del fitoplasma para *Macunolla ventralis*, *Hortensia similis*, *Acusana sp.*, *Sibovia sp.*, *Agallia sp.*, *Tylozygus fasciatus*, *Agrosoma bispinella*, *Sterellus bicolor* (Figuras 3 y 4). De las raíces analizadas, se incluyeron en diferentes grados de severidad, y aunque a la vista con síntomas característicos de la enfermedad en con el PCR anidado no dieron positivos. Lamentablemente no se pudo avanzar en esta investigación para poder demostrar que estos insectos son vectores, ya que (Contaldo *et al* 2016 y Betancourth *et al* 2019), lograron por primera vez, en el mundo, que se consolidara la información suficiente, donde los aislamientos del fitoplasmas se pueden reproducir en un medio artificial. Al tener este gran logro posteriormente se pueden realizar las investigaciones para poder probar que estos insectos pueden llegar a ser vectores.

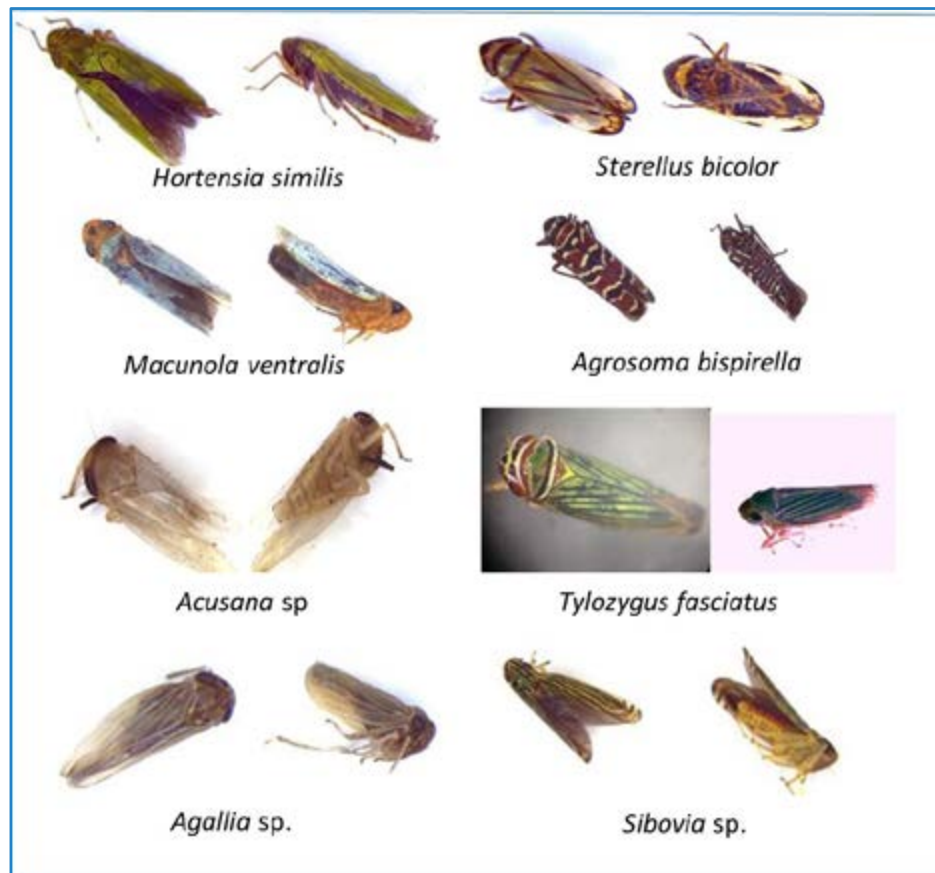


Figura 2. Especies de Cicadellidae que fueron positivas como portadores del fitoplasma que produce la enfermedad de cuero de sapo. Costa Rica. 2017-2018.

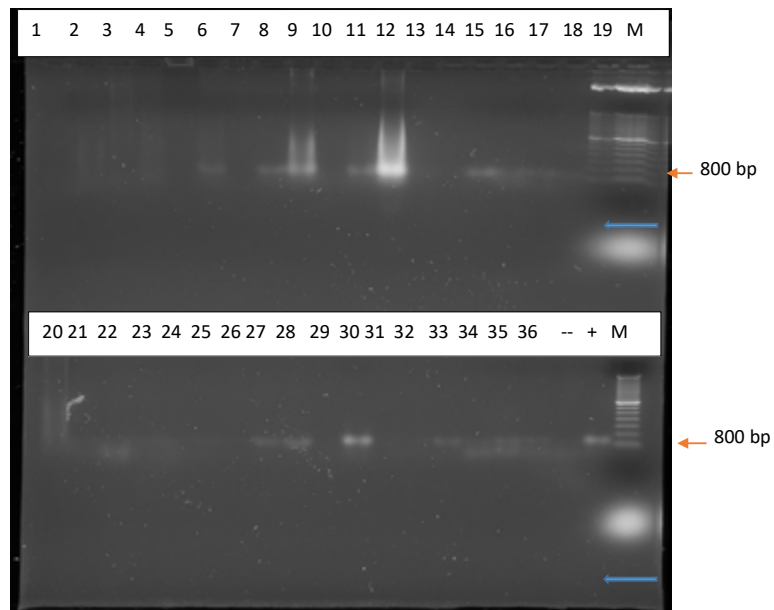


Figura 3. Electroforesis del PCR 3, mostrando los positivos de las especies de insectos portadoras. Las muestras del 1-19 corresponden a raíces de diferentes fincas con diferentes grados de severidad de 2-4, las muestras 20 y 21 corresponden a *Macunola ventralis*, 22 y 23 a *Hortensia similis*, 26 y 27 a *Acusana* sp., 28 y 29 a *Sibovia* sp., 30 y 31 a *Agallia* sp., 32 y 33 a *Tylozygus fasciatus*, 34 y 35 a *Agrosoma bispinella*, (+ es el positivo), (- negativos). M: marcador de peso molecular, (Hyper ladder II (bioline) 100 lanes).

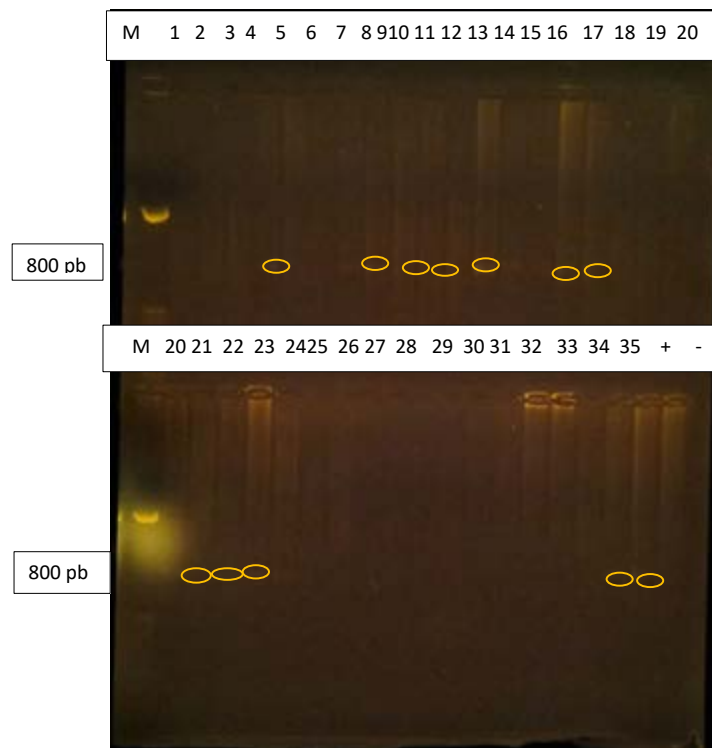


Figura 4. Dos salidas de electroforesis de diferentes muestras, con salida del PCR3, donde algunas dieron positivo, algunas muestras corresponden a insectos que fueron positivos 5- *Macunola ventralis*, 8- *Acusana* sp, 10- *Agallia* sp, 12-13 *Hortensia similis*, 16 -17 *Agrosoma bispinella*, 23-*Tylozygus fasciatus*, + es el positivo. M: marcador de peso molecular, (Hyper ladder II (bioline) 100 lanes).

Los fitoplasmas son transmitidos por insectos del Orden Hemiptera y las familias Cicadellidae, Cixidae, Cercopidae, Psillidae y Fulgoridae. Estos se multiplican en el interior del insecto y persisten hasta su muerte. Aunque no se transmiten a la descendencia, se ha podido demostrar la transmisión vertical de los fitoplasmas que transmiten la flavesencia dorada (*Flavescence dorée*, FD) y la hoja blanca de la caña (Sugarcane white leaf) SWL en los vectores *Scaphoideus titanus* Ball (Gaur *et al.* 2008) y *Matsumuratettix hiroglyphicus*, Matsumura (Gomes *et al.* 2004). Los insectos que llegan hasta el floema de la planta, principalmente los saltahojas como el saltahoja de la papa (*Empoasca fabae*) y el saltahoja del Aster (*Macrosteles quadrilineatus*), transmiten los fitoplasmas de planta a planta (Davis *et al.* 2015) También han sido identificadas ciertas especies de la familia Pyllidae como vectores transmisores de enfermedades causadas por fitoplasmas como el amarillamiento de frutas de hueso Stone fruit yellows (Arocha and Jones 2008) y la proliferación de la manzana (Apple proliferation) (Bernamini *et al.* 2002a). Se caracterizaron a nivel molecular fitoplasmas en zanahoria, repollo y cebolla identificando al 16SrII-D y resultaron positivos también los insectos *Empoasca spp.* *O. albicinctus*, *A. bigutula Nervosa spp.* (Sharif *et al.* 2019). En la investigación de (Zambon *et al.* 2019), lograron identificar tres especies de fitoplasmas en el cultivo de la vid portados en dos especies de insectos.

Una de las especies capturadas, pero no fue positiva en nuestro caso, es de suma importancia en el seguimiento en las zonas yuqueras es *Scaphytopius* sp. (figura 5). Esta fue identificada como el agente causal del “Cuero de sapo”, en Colombia (Álvarez *et al.* 2010).



Figura 5. Género *Scaphytopius* sp. se encontró en la Región Huetar Norte. Costa Rica. 2019.

Es posible que la diseminación inicial de la enfermedad de “Cuero de sapo” a la Región Caribe se debió al traslado de semilla contaminada de la Región Huetar Norte, la cual fue reportada desde 1997. Por lo tanto, se recomienda a los productores no cosechar ni acarrear semilla de esta región, por el contrario, se les insta a producir su propio material y preferiblemente en sus propias fincas.

La baja proporción de insectos portadores encontrada (menor al 1%) concuerda con lo registrado en numerosos estudios a campo de fitoplasmas. Por ejemplo, sólo del 1-40% de los individuos de *Cacopsylla pyricola* (Foerster) eran portadores del fitoplasma del “declinamiento del peral” (Musetti *et al.* 2005), el porcentaje de *Macrosteles quadrilineatus* (Forbes) portadores del fitoplasma del “amarillamiento del aster” fue de 3 a 5% (Prince *et al.* 1993) y Perilla (2013) hallaron solamente el 3% de los especímenes de *Dalbulus maidis* portadores del fitoplasma causal de Maize bushy Stunt. Por lo tanto, debido a la baja cantidad de individuos recolectados de las restantes especies, no puede descartarse que estas puedan ser vectores del fitoplasma causal del “cuero de sapo”.

LITERATURA CITADA

- Alma, A; Lessio, F; Nickel, H. 2019. Chapter 1 Insects as Phytoplasma Vectors: Ecological and Epidemiological Aspects. Book: Pathogenic Bacteria - II, A. Bertaccini et al. (eds.), https://doi.org/10.1007/978-981-13-2832-9_11
- Álvarez, E; Gómez-Bonilla, Y. Zacher, M; Campo, R. 2015. INFORME TECNICO: Innovaciones tecnológicas en el manejo integrado del Cuero de Sapo de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz): Estrategias para reducir el impacto de la enfermedad por efectos del cambio climático en Colombia, Costa Rica y Paraguay FTG-100382010 Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). <http://www.fontagro.org/new/uploads/adjuntos/Informe-Final-Fontagro-31-Julio.pdf>
- Álvarez, E; Pardo, J. 2013. Diseño de sonda TaqMan® y cebadores específicos para la detección de fitoplasmas asociados a la marchitez letal en Palma de Aceite (*Elaeis guineensis*). Cali, Colombia. Informe Técnico, archivo Patología de Yuca. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 85 p.
- Álvarez, E; Mejía, JF; Pardo, JM. 2010. Development of a Real-time PCR assay, to detect and quantify a 16SrIII-L Phytoplasma associated with cassava frogskin disease (CFSD). *Phytopathology* 100(6):100-105.
- Álvarez, E; Mejía, JF; Llano, G; Loke, J; Calari, A; Duduk, B; Bertaccini, A. 2009. Detection and molecular characterization of Phytoplasma associated with frogskin disease in cassava. *Plant Disease* 93:1139-1145.
- Álvarez, E, Mejía, JF, Llano, GA, Loke, JB, Calari, A, Duduk, B, Bertaccini, A. 2009. Characterization of a phytoplasma associated with frogskin disease in cassava. *Plant Dis.* 93:1139-1145
- Arocha, Y; Jones, P. 2008. Phytoplasmas affecting sugarcane and papaya in Cuba. In Harrison, N; Rao, GP. and Marcone, C. (eds) Characterization, diagnosis and management of phytoplasmas. Studium Press LLC. Texas. p. 249-273.
- Arismendi, N; Carrillo, R; Andrade, N. 2010. Mollicutes fitopatógenos transmitidos por insectos: Interacciones y efecto en sus vectores. *Agro Sur.* 38(2):55-67.
- Bertamini, M; Grando, M; Muthuchelian, K; Nedunchezian, N. 2002a. Effect of phytoplasma infection on photosystem II efficiency and thylakoid Membrane protein changes in field grown apple (*Malus pumila*) leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 61:349-356.
- Betancourth, C; Pardo, JM; Muñoz; Álvarez, E. 2019. Isolation of phytoplasmas associated to frogskin disease in cassava. *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient.* 22(1):1177. <https://doi.org/10.31910/rudca.v22.n1.2019.1177>.
- Bianco, PA; Romanazzi, G; Mori, N; Myrie, M; Bertaccini, A. 2019. Chapter 11 Integrated Management of Phytoplasma Diseases. Book: Pathogenic Bacteria - II, A. Bertaccini et al. (eds.). 237-258. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2832-9_11
- Blanco Rodríguez, E. 2014. Cicadélidos (Hemiptera: Cixiellidae) asociados a cítricos en la Península de Yucatán. Tesis de Maestro en Ciencias del Colegio de postgraduados del Instituto de enseñanza e investigación en Ciencias Agrícolas, Montecillo, Texcoco, México. 76 p.
- Brodbeck, BV; Andersen, PC; Mizell III, RF. 1995. Differential utilization of nutrients during development by xylophagous leafhopper, *Homalodisca coagulata*. *Entomologia experimentalis et applicata* 75:279-289.
- Calvert, L; Cuervo, M. 2002. Cuero de Sapo: yuca en el tercer milenio. Sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización. Ospina, B; Caballos, H (eds). p. 264-268.
- Contaldo, N; Satta, E; Zambon, Y; Paltrinieri, S; Bertaccini, A. 2016. Development and evaluation of different complex media for phytoplasma isolation and growth. *J. Microbiological Methods.* 127:105-110. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.05.031>

- Contaldo, N; Bertaccini, A; Paltrinieri, S; Windsor, H; Windsor, D. 2012. Axenic Culture of plant pathogenic phytoplasmas. *Phytopathologia Mediterranea*. 51(3):607-617.
- Davis, R; Dally, E; Zhao, Y; Lee, I; Wei, W; Wolf, T; Beanland, L; LeDoux, D;
- Johnson, D; Fiola, J; Peterson, H; Dami, I; Chien, M. 2015. Unraveling The Etiology of North American Grapevine Yellowing (NAGY): Novel NAGY Phytoplasma Sequences Related to 'Candidatus Phytoplasma pruni'. *Plant Disease* 99(8):1087-1097.
- Gaur, RK, Raizada, R; Rao, GP. 2008. Sugarcane yellow leaf phytoplasma associated for the first time with sugarcane yellow leaf syndrome in India. *Plant Pathology* 57:772.
- Gibb, K; Padovan, A; Mogen, B. 1995. Studies on sweet potato little-leaf phytoplasmas detected in sweet potato and other plant species growing in Northern Australia. *Phytopathology* 85:169-174.
- Gomes, A; Jardim, S; Teixeira-Guimaraes, C; de Souza, E; Oliveira, E. 2004. Genetic variability of Brazilian phytoplasma and spiroplasma isolated from maize plants. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 39:61-65.
- Godoy, C; Garita-Cambronero, J; Rivera, C. 2006. New species of *Kapateira* Young from Costa Rica. *Zootaxa* 1282:29-38.
- Gundersen, D; Lee, I; Schaff, D; Harrison, N; Chang, C; Davis, R; Kingsbury, D. 1996. Genomic diversity and differentiation among phytoplasma strains in 16s rRNA groups I (aster yellows) and III (X-disease). *International Journal Systematic Bacteriology* 46: 64-75.
- Hill, D. 1994. *Agricultural entomology*. Oregon, US. Timber Press. 635 p.
- Knight, WJ. 2010. Leafhoppers (Cicadellidae) of the Pacific. An annotated systematic checklist of the leafhoppers recorded in the Pacific region during the period 1758 – 2000 (en línea). London, UK. 332 p. Consultado 14 de julio 2020. Disponible en <http://www.tymbal.org/publicat/KnightCatalogue.pdf>.
- Maes, JM; Godoy, C. 1993. Catálogo de los Cicadellidae (Homóptera) de Nicaragua. *Rev. Nica. Ent.* 24:5-34.
- Musetti, R; Sanità Di Toppi, L; Martini, M; Ferrini, F; Loschi, A; Favali, M; Osler, R. 2005. Hydrogen peroxide localization and antioxidant status in the recovery of apricot plants from European Stone Fruit Yellows. *European Journal of Plant Pathology* 112:53-61.
- Nielson, MW. 1979. Taxonomic relationships of leafhopper vector of plant pathogens. *In* Leafhopper vector and plant disease agents. Maramorosch, K; Harris, KF (eds). Londres, GB. Academic press. p. 3-27.
- Lee, I; Hammond, R; Gundersen, D. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83:834-842.
- Pardo, JM; Truke, MJ; Cardozo, L; Varela, I; Álvarez, E. 2015. A real-time PCR assay to detect and quantify 16SrIII-L and 16SrI phytoplasmas associated with cassava frogskin disease in Costa Rica and Paraguay. *Phytopathology*. 105 (3): 1p. Supplement: 1
- Perilla, L. 2013. Determinación de la capacidad de transmisión de fitoplasmas en
- Dos morfoespecies de la familia Cicadellidae (Hemiptera: Auchenorrhyncha). Tesis Mag. Sc. Bogotá, Colombia. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Departamento de Química. 137 p.
- Pineda, B; Jayasinghe, U; Lozano, JC. 1983. La enfermedad "Cuero de Sapo" en yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *ASIAVA* 4:10-12.
- Prince, J; Davis, R; Wolf, T; Lee, I; Mogen, B; Dally, E; Bertaccini, A; Credi, R; Barba, M. 1993. Molecular detection of diverse mycoplasma like organisms (MLOs) associated with grapevine yellows and their classification with aster yellows, X - disease, and elm yellows MLOs. *Phytopathology* 83:1130-1137.
- Redak RA; Purcell AH; Lopes JSR; Blua MJ; Mizell III RF; Andersen PC. 2004. The biology of xylem fluid-feeding insect vectors of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology. *Annual Review of Entomology* 49:243-70.

Sambrook, J; Fritsch, E; Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 215 p.

Saunders, JL; Coto, D; King, AB. 1998. *Las plagas invertebradas de cultivos anuales alimenticios en América Central*. San José, Costa Rica, CATIE. 305 p.

Sharif, NZ; Ahmad, SJ; Tahir, M; Ziaf, K; Zhang, SH; Ahmad, JM. 2019. Molecular Identification and Characterization of Phytoplasmas associated with Carrot, Cabbage and Onion crops and their insect vectors in Punjab, Pakistan. *Pak. J. Agri. Sci.*, 56(2):407-414. DOI:10.21162/PAKJAS/19.7152.

Smart, C; Schneider, B; Blomquist, C; Guerra, L; Harrison, N; Ahrens, U; Lorenz, K; Seemuller, E; Kirkpatrick, B. 1996. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Applied Environment Microbiology*, 62:2988-2993.

Torres, E; Bertolini, B; Cambra, M; Montón, C; Martín, M. 2005. Real-time PCR for simultaneous and quantitative detection of quarantine phytoplasmas from apple proliferation (16SrX) group. *Molecular and Cellular Probes* 19:334-340.

Zambon, Y; Canel, A; Bertaccini, A; Contaldo, N. 2018. Molecular Diversity of Phytoplasmas Associated with Grapevine Yellowing Disease in Northe-Eastern Italy. *Phytopathology*. 108:206-214. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-0253-R>

PRODUCCIÓN DE PLÁNTULAS DE YUCA BAJO LA TÉCNICA DE SISTEMA AUTOTRÓFICO HIDROPÓNICO (SAH)¹

Yannery Gómez-Bonilla²- Jeannette Avilés Ch.² - Hazel Mena², Gaudy Ortíz²

RESUMEN

Producción de plántulas de yuca bajo la técnica de Sistema Autotrófico Hidropónico (SAG). La semilla es factor fundamental para garantizar la calidad y la productividad de un cultivo, así la obtención de semilla de calidad está directamente relacionada con una mayor producción. Con la multiplicación de plantas *in vitro* en la fase de endurecimiento se tenían pérdidas de 95-99 % de las plántulas. Este trabajo consistió en utilizar la técnica de Sistema Autotrófico Hidropónico (SAH) aplicarla en yuca para lograr una mayor sobrevivencia de las plantas. El ensayo fue realizado en la Estación Experimental Los Diamantes en tres años, donde se evaluaron en laboratorio, invernadero, vivero y campo la sobrevivencia y producción de plantas de yuca. En ese periodo se ajustó los tiempos de cada una de las fases y se determinaron los rendimientos. Los resultados obtenidos en el presente proyecto fueron los siguientes: 1) Se logró con la técnica que el 98% de las plántulas sobreviviera en la fase de endurecimiento. 2) Las plántulas adoptando esta técnica tendrán (los cuidados de riego, fertilización y aplicación de plaguicidas para el combate de plagas y enfermedades que se pudieran dar en el lugar 3) Las plantas *in vitro* y en multiplicación por SAH en campo en comparación con la estaca normal (40 cm), tiene un excelente desarrollo y su rendimiento es superior, 4) Se comprobó en el campo que las mini estacas de 2-3 nudos tienen un buen rendimiento y desarrollo, comparable con la estaca normal, 5) Se validó y dio seguimiento en el campo la segunda siembra de la semilla producida *in vitro*, con excelente rendimiento y producción de raíces, lográndose un 98% de plantas adaptadas en campo.

Palabras clave: *In vitro* yuca, micropropagación, macropropagación, sistema hidróponico.

Keywords: *In vitro* cassava, micropropagation, macropropagation, system hydroponic

1 Fittacori e Instituto Nacional de innovación y transferencia de tecnología.

2 Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnologías Agropecuaria, INTA. yangomez27@yahoo.com, ORCID: 0000-0002-4229-7434, j.aviles05@gmail.com, hmena@inta.go.cr, gortiz@inta.go.cr, San José, Costa Rica.

INTRODUCCIÓN

La yuca es un cultivo de gran importancia para el pequeño y mediano productor de trópico húmedo costarricense. Las principales zonas productoras de este cultivo son la Región Huetar Norte, (San Carlos, Los Chiles y Upala) y la Región Huetar Caribe (Pococí y Guácimo). El área sembrada de yuca pasó de 3.092 a 9.000 ha en un lapso de 17 años (1990 a 2007), alcanzando su máximo pico en el año 2005, con 15.000 ha (INEC, 2015).

Para que una semilla realmente tenga impacto en la agricultura, es necesario que, además de ser de alta calidad y de una variedad mejorada, sea usada extensamente por los agricultores, de esta manera aumentará la producción, ayudará a un uso más eficiente de insumos debido a una mayor uniformidad de emergencia y vigor de plantas, y más si se trata de un cultivo como la yuca que se multiplica en forma vegetativa a través de estacas-semilla. Si bien es cierto esta forma de multiplicación es una ventaja ya que permite mantener las características propias de la variedad por generaciones, tiene la desventaja que es una fuente eficaz para la diseminación de plagas y enfermedades que afectan grandemente al cultivo de yuca (Velásquez Carrera, 2018).

Con el desarrollo de sistemas de propagación clonal en los laboratorios, como es la técnica de propagación *in vitro*, se puede eliminar la planta algunas de enfermedades (sobre todo bacterias y virus) mediante diversas técnicas como termoterapia y poner a disposición de los agricultores material de siembra limpio sano y certificado con la seguridad de que: (1) las plantas estarán libres de enfermedades, (2) corresponde al clon o la variedad que se necesita, (3) se evitan confusiones o mezclas entre variedades y (4) en la cosecha se obtendrá una mejor producción. Actualmente se cuenta con la micropropagación por medio de la producción *in vitro* de plántulas de yuca, sin embargo, esta metodología necesita equipo especial, los medios de cultivo están expuestos a contaminación por lo que se debe seguir una rigurosa esterilización y la climatización de las plántulas a condiciones fuera del laboratorio es difícil (FAO 2007).

Roosevelt *et al.* (2012) destaca que “la técnica del cultivo de tejidos consiste en tomar de una parte de una planta (tallos, ramas, hojas, raíces, etc.) porciones de tejido u órganos (diferenciados o no), los cuales se colocan en un medio nutritivo especial, bajo condiciones controladas de luz y temperatura para que continúen su desarrollo, tal y como lo hacía en la planta “madre”. Para lograr este crecimiento y desarrollo se debe eliminar la microflora contaminante externa (hongos y bacterias entre otras), mediante un proceso conocido como des-infestación, para evitar que sigan creciendo en el medio de cultivo; si no se controlan estos contaminantes podrían matar el tejido vegetal usado para iniciar el proceso. Por este motivo, es necesario siempre mantener los cultivos de tejidos libres de contaminantes, o sea, en forma aséptica”. Sin embargo, los laboratorios tienen grandes problemas en la fase de endurecimiento de la plántula de yuca ya que se pueden tener pérdidas de 95-98%.

Otra técnica de propagación es Sistema Autotrófico Hidropónico (SAH), desarrollado por el (INTA de Argentina y SAH Tecno) que se utiliza en el cultivo de papa, como parte de su proceso de multiplicación acelerada de plántulas para la producción de semilla élite. Con esta técnica no se requiere de equipo especial para la producción de las plántulas, y se da una reducción de pérdidas por contaminaciones, además este tipo de reproducción produce plántulas más rústicas ya que desde que están en crecimiento ya están fotosintetizando, por lo cual se espera una disminución de pérdida al trasplante, esta técnica produce un incremento exponencial, mayor cantidad de plántulas en menor tiempo. Estas plántulas serán de mayor tamaño, mejor funcionamiento fisiológico y crecimiento uniforme (Riatio *et al.* 2018). El Sistema Autotrófico Hidropónico (SAH), consiste en reproducir las plantas *in vitro*, mediante la corta de esquejes, los cuales se colocan en un sustrato libre de patógenos, en cajas con una solución nutritiva hidropónica. Esta técnica tiene la ventaja de que las plantitas están fotosintetizando desde un inicio y la planta se mantiene en el mismo sustrato.

Siendo el medio de reproducción de yuca, la estaca-semilla, un factor fundamental para garantizar la calidad y la productividad de un cultivo, la siembra de estacas de mala calidad puede perjudicar una siembra, aun cuando las demás condiciones sean favorables al cultivo. Así, la obtención de estaca-semilla de calidad está directamente relacionada con una mejor producción y esta

técnica nos puede garantizar una micro propagación masiva del cultivo de yuca.

Objetivo general

evaluar técnica del SAH para la fase de endurecimiento en plantas *in vitro* de yuca.

MATERIALES Y MÉTODOS

Comparar la producción y multiplicación de plántulas de yuca por medio de la técnica SAH e *in vitro* en la fase de endurecimiento en el laboratorio

Este trabajo de investigación fue desarrollado en la Estación Experimental los Diamantes, contando con la ayuda y colaboración de todo el equipo de trabajo del Laboratorio de Cultivo de Tejidos y el Coordinador de la Estación.

Se tomaron plantas de cultivo *in vitro* de los frascos (con al menos una buena hoja y vigorosas como para la corta del esqueje) y se colocaron sobre la toalla húmeda (esterilizada). Se realizó el corte de las plántulas con bisturí para obtener los esquejes apicales, medios y basales (se recomienda con dos nudos). Estos últimos incluyen parte de las raíces que deben de estar libres de agar. Se plantaron 20 esquejes por caja plástica de 40x20x10 cm, con sustrato de turba, se regó con una solución nutritiva hidropónica y se dejó reposar hasta que se absorbió. Posteriormente se realizó un pequeño hoyo en el sustrato con la punta de un lápiz, se tomó el esqueje con la pinza y se planta aplicando una leve presión. Las cajas permanecieron cerradas durante tres semanas y se mantuvieron a 24 °C con 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

Luego, las cajas se sacaron del laboratorio y se llevaron al invernadero, con ayuda de una cuchara, se extrajeron las plántulas de la caja y se colocaron en bolsas de plástico de dos kg llenas con 2:1 arena-tierra, fueron previamente coladas, esterilizadas y mezcladas. A estas plantas se les nombró como plantas (madre), cada planta fue tapada con un vaso plástico transparente, para

ayudar a mantener la humedad relativa. Este vaso se dejó por 7-8 días, luego se retiró y se dejó la planta en el invernadero por 3-4 semanas. Se evaluó el número de plantas sobrevivientes.

Las plántulas de yuca, después de retirar el vaso, se dejaron en el invernadero de 4-5 semanas, hasta que ellas estén bien ancladas y endurecidas. Se hizo la primera aplicación de dos gramos de fertilizante 10-30-10 y riego día por medio o según las condiciones ambientales.

Al cabo de este tiempo, las plantas fueron pasadas al vivero, las que se observaron muy pequeñas o faltas de desarrollo, se dejaron en el invernadero un par de semanas más y luego se pasaron al vivero. Las plantas en el vivero a los 6-8 semanas, crecieron aproximadamente un metro. En este tiempo se les aplicó fertilizante foliar y fungicidas e insecticidas por los posibles ataques de plagas y enfermedades. Las plantas fueron cortadas con tijera de podar sobre la base a dos nudos. Las plantas se llevaron al invernadero, donde se les quitaron las hojas y se cortó estacas de 3-4 nudos, se introducen en una solución enraizadora por dos minutos y luego se sembraron en bolsas de un kg de mezcla de 2:1 de tierra y arena, descrito anteriormente. A todas las plantas cortadas (plantas hijas) se les hizo aplicación de fungicidas para curar la herida hecha. Estas plantas se dejaron en el invernadero por 3-4 semanas, para luego ser llevadas al vivero para su desarrollo.

Las plantas del vivero se les hizo cortes en el tiempo, según necesidad de plantas a multiplicar, se continuó con aplicaciones de abono foliar, fungicidas e insecticidas, hasta ser llevadas a campo. Las plantas hijas crecidas en el vivero, también se les hizo uno o más cortes para sacar otras plantas hijas, les tomó unas 4 semanas desarrollarse para ser llevadas a campo.

Las plantas hijas después de al menos 4 semanas de estar en el invernadero se llevaron nuevamente al vivero. Las plantas en el vivero,

no se dejaron crecer mucho tiempo, porque se vuelcan. Al volcarse de los entrenudos salen nuevos brotes, que son muy débiles, además del peligro de que se llenan de diferentes enfermedades. Todas las plantas que fueron cortadas se le aplicó fungicida a la herida para evitar la entrada de enfermedades. Las plantas del vivero que son llevadas a campo, lo ideal es que tengan un tamaño de 20-30 cm, ya que por el transporte se maltratan mucho y se corre el riesgo de que la planta se quiebre y se quiebren las hojas.

Comparar rendimientos con las diferentes técnicas de multiplicación de plantas de yuca en campo

Se realizó un ensayo de campo, para la comparación del desarrollo y el rendimiento de diferentes técnicas de multiplicación de plantas de yuca.

Este ensayo fue sembrado en un diseño de bloques completos al azar, para comparar los rendimientos de las diferentes técnicas de multiplicación de las plantas y su desarrollo. Los tratamientos evaluados fueron:

1. Micro propagación *in vitro* (primera siembra =S1).
2. Micro propagación con la técnica SAH (primera siembra =S1).
3. Macro propagación por mini estacas (estacas 2-3 nudos). Estacas de la estación (octava siembra =S8).
4. Macro propagación por mini estacas (estacas 2-3 nudos). Estacas Agricultor de Cariari (sin conocimiento del número de siembras).
5. Testigo relativo: Macro propagación por medio de estacas de 30-40 cm (5-9 nudos) S8.

Las variables que se evaluaron fueron:

- A. Número de plantas que sobreviven
- B. Medición cada mes de grosor y altura (5 plantas por repetición).
- C. Rendimiento:
 1. Número de raíces
 2. Peso de raíces por planta

Diseño experimental

Bloques completos al azar. Cinco tratamientos y cuatro repeticiones, en cada repetición se sembró un total de 20 plantas. Las plantas fueron sembradas en lomillo a 0.5 cm y entre surcos a 1 m.

Para la siembra de los tratamientos 1 al 2, se hizo hueco en el surco, se quitó la bolsa y se sembraron con todo y la tierra que trae, se presionó un poco para buen anclaje de la planta al suelo. En el caso de la mini estaca, éstas fueron cortadas 15 días antes de la siembra, cada dos nudos y fueron sembradas en bolsas con la tierra preparada de manera vertical, se dejaron en el invernadero para su desarrollo. La siembra en el campo fue igual a los tratamientos 1 y 2.

En el caso del tratamiento 5 la siembra de estacas (testigo) se sembró en un ángulo de 45° directamente en el suelo en el campo, presionando también la tierra en la estaca.

La unidad experimental fue una planta, para un total de 3 plantas por parcela. El manejo agronómico fue llevado por el equipo de Raíces y Tubérculos según se acostumbra en la Estación Experimental los Diamantes.

Análisis de datos

1. Análisis de varianza con prueba de medias según Duncan
2. Porcentaje de sobrevivencia de las plantas en campo.

Validar rendimiento de plantas de yuca en campo en el tiempo

Para esta validación, se tomó la semilla de la primera siembra (S1) de las plantas del ensayo de comparación de técnicas. Aquí se midió en el tiempo la degradación de la semilla *in vitro* y por reproducción de la técnica SAH.

Se sembraron hileras de al menos 100 estacas de semilla producida del punto 4), se sembró para el periodo 2019-2020.

Los tratamientos fueron sembrados por estacas en un ángulo de 45°, presionando también la tierra en la estaca,

Se evaluaron los siguientes tratamientos:

1. Micro propagación *in vitro* (2S= segunda siembra)
2. Micro propagación con la técnica SAH (2S)

3. Macro propagación por mini estacas (estacas 2-3 nudos). Estacas de la estación (S9)
4. Testigo relativo: Macro propagación por medio de estacas de 30-40 cm (5-9 nudos) (S9).
5. Micro propagación con la técnica SAH2, plantas más tiempo en vivero (S1)

Variables:

- A. Número de raíces
- B. Rendimiento

El ensayo fue sembrado en agosto del 2019 y cosechado en setiembre 2020. Las semillas de este ensayo fueron sembradas y se continuó con la medición del rendimiento.

Diseño experimental

Este ensayo fue sembrado en Las Guineas, que es una sección del campo experimental de la EELD. La siembra fue de dos surcos continuos con 50 plantas, para cada uno de los tratamientos. Las plantas fueron sembradas a 0.5 cm entre plantas y a un metro entre surcos. Alrededor se siembra yuca amarga, por problemas de robo como cortina de protección.

Análisis de datos

1. Estadística descriptiva, promedios, totales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Comparar la producción y multiplicación de plántulas de yuca por medio de la técnica SAH (desarrollado por el INTA de Argentina y SAH TEC) e *in vitro* en la fase de endurecimiento en el laboratorio

Con esta técnica se pretende sustituir la fase de endurecimiento (una fase de desarrollo del cultivo de yuca de plántulas *in vitro*), donde se tiene una pérdida de plántulas de > al 95%. De ahí se ajustó la estancia de las plantas en cada una de las fases. Las cajas ya con turba, se concertó haciendo 20 hoyos para la siembra de

los esquejes. Los esquejes dentro de la caja SAH deben permanecer de 3-4 semanas, estuvieron todo el tiempo cerradas, ya que al abrirse corren el riesgo de contaminación, luego fueron trasladadas por la tarde al invernadero, a la mañana siguiente se hizo el trasplante (figura 1). En esta fase se logró un 98% de sobrevivencia de las plántulas.



Figura 1. Plántulas desarrolladas después de 3-4 semanas en cuarto de crecimiento

La plántula de yuca con una cuchara fue tomada con toda la raíz y resto de la tierra y se sembró individualmente en bolsa de al menos 2 kg de mezcla de tierra y arena, presionando la planta en la tierra (figura 2 y 3), esto permitió que en las siembras posteriores con la técnica SAH, se obtuvieron un 98% de sobrevivencia de plantas lo que demostró el gran éxito de la técnica.



Figura 2. Trasplante de plántulas de la caja SAH a bolsas previamente llenas de tierra y arena, presionar bien la planta con el substrato, y luego colocar encima un vaso transparente con un pequeño agujero en el fondo. Este vaso debe permanecer al menos 8-10 días desde el trasplante.



Figura 3. Trasplante y siembra en bolsas, todas tapadas con el vaso plástico para mantener el microclima de la planta en el invernadero.

Aunque hay informes disponibles sobre la aclimatación de las plantas *in vitro* de la yuca desarrollado en el mundo, los protocolos son difíciles y costosos de implementar en los países en desarrollo dado que la tecnología es intensiva en capital, trabajo y energía (Ahloowalia *et al.* 2004). Una de las problemáticas que se tiene con el cultivo de yuca, es la fase de endurecimiento, la planta de yuca es muy débil y delicada y de difícil anclaje en la tierra y la mayoría de las plantas son curvadas.

Con la técnica de SAH utilizado solo en papa, se adaptó al cultivo de yuca, lo cual produjo resultados excelentes.

El invernadero en las primeras dos semanas se mantuvo puesta la malla negra en la parte superior y las plántulas permanecieron al menos 4-5 semanas y posteriormente fueron pasadas al vivero para su fortalecimiento (figura 4).



Figura 4. A. Plantas madre con vaso transparente para mantener microclima y para su fortalecimiento. B. Plantas madres después de quitar el vaso.

En el invernadero también se mantuvo otro grupo de plantas, las plantas “hijas”, que son las que vienen del vivero, una vez que las plantas madre se han desarrollado, con una altura de 60-80 cm y tiene mayor grosor el tallo. Estas plantas madre, fueron cortadas al 2-3 nudo sobre la base y se dejaron en el vivero. Las plantas cortadas, se le quitan todas las hojas y cortan en estacas de 3-4 nudos, con las yemas hacia arriba, se siembran en bolsas de almacigo de un kg con la mezcla de tierra y arena (figura 5). Estas plantas permanecieron en el invernadero de 3-4 semanas, se les aplicó 2 g de fertilizante y fungicidas a todas las plantas cortadas, además del riego diario o según condiciones ambientales.



Figura 5. Estacas de las plantas madre, después de haber permanecido en el vivero al menos cuatro semanas.

El potencial de micropropagación de la yuca es grande, especialmente en casos de multiplicación de materiales libres de patógenos (Mabanza *et al.* 1994), gracias a esta técnica en el invernadero la fase de endurecimiento, el porcentaje de pérdida de plantas fue menor. Pedroso *et al.*, (2000), indica que el sistema de eficiencia de la aclimatación son los factores importantes para la calificación de un sistema de micropropagación. En esta fase las plántulas fueron trasplantadas y colocado el vaso transparente encima que cubra toda la planta, se dejó durante 8-10 días, para mantener el microclima (figura 5). En esta fase de aclimatación con la técnica SAH los investigadores que han trabajado con este sistema en el cultivo de papa, hacen las comparaciones del número y tamaño de tubérculos (Andrade *et al* 2017; Hanhineva *et al* 2005; Rigato *et al* 2001), en nuestro caso como fue la primera experiencia en el cultivo de yuca no se tiene comparador con esta técnica. Sin embargo, esta fase de endurecimiento en otros laboratorios como en el trabajo de Sessou *et al.* (2020) que lograron un 98% de sobrevivencia, el caso de

(Pedroso *et al.*, 2000), no reportan tener problemas en la fase de endurecimiento y logran una sobrevivencia del 92% de aclimatación de las plantas, pero menciona (Tumwegamire *et al.*, 2018) que es muy factible tener una alta probabilidad de muerte prematura durante la aclimatación.

En este tiempo la planta se fue aclimatando a las condiciones de campo y desarrollando y en 5-6 semanas puede tener una altura de 60-80 cm o más (figura 6), donde se realizó el primer corte para multiplicación de la planta de yuca. Aquí las plantas en el mismo vivero fueron cortadas sobre la base de la planta al 2-3 nudo (figura 7), la planta madre se dejó en el mismo lugar y las plantas cortadas fueron llevadas al invernadero para el corte de estacas (3-4 nudos) para obtener nuevas plantas hijas.

La primer entrega de plantas a la EELD para lote semilla, fue de 4500 plantas, donde se tuvo una pérdida de un 20% en campo.



Figura 6. Plantas en vivero, listas para ser cortadas y multiplicar.



Figura 7. Corte de plantas hijas con 3-4 nudos (A), se dejan en el invernadero (3-4 semanas)

Comparar rendimientos con las diferentes técnicas de multiplicación de plantas de yuca en campo

La sobrevivencia de las plantas del primer ensayo de comparación de técnicas de multiplicación del cultivo de yuca, se observa en el Cuadro 1, el número de plantas sobreviviente al mes 9, de las plantas de *in vitro* quedaron solo 66% plantas vivas y de técnica SAH de 47%, en comparación con las estacas normales de siembra que sobrevivió 81% plantas. Ospina *et al.* (2007) indica que la mayoría de las pérdidas de plantas *in vitro* ocurren durante trasplante, es decir, cuando las plántulas se mueven de una prueba tubo a una bolsa de plástico llena de tierra y luego transferida al campo. Este trasplante directo es muy sensible para la yuca. Si la transferencia no se realiza con especial cuidado, el porcentaje la pérdida será muy alta (del 50 al 95%), también se informó que el trasplante de choque en el suelo se debe principalmente al escaso vigor de las plántulas (Cuesta *et al.* 2010) y el crecimiento de raíces (Ospina *et al.* 2007), especialmente cuando las plantas proceden de origen *in vitro*. En el estudio de (Acedo y Corazon 2008), ellos mencionan que tuvieron problemas con las plantas que traían *in vitro* en campo de los clones que estaban evaluando e indican que es necesario establecer el protocolo óptimo para la micropropagación de la mayoría de los genotipos que evaluaron,

Cuadro 1. No. De plantas sobrevivientes de las diferentes técnicas de propagación del cultivo de yuca.

	Tratamientos	Medidas
1	Invitro	65,78
2	SAH	46,68
3	Miniestacas (Estación)	68,3
4	Miniestacas (Cariari)	82,7
5	Estaca 30-40	80,75

En la segunda multiplicación de plántulas producidas por la técnica SAH, las plantas llevadas a campo para lotes de semilla, venían del vivero, en esa oportunidad se tenían en el vivero plantas madre (con dos cortes), plantas hijas que también se les había realizado un corte. Estas nuevas plantas hijas tuvieron seis semanas después del corte (como mínimo), antes de ser llevadas a campo (figura 8). En esta oportunidad se sembraron 4500 plantas y sobrevivieron 92%, de las plantas que murieron algunas habían sido maltratadas por transporte. La tercera siembra de plantas (para los lotes semilla), en igual de condición que la segunda (plantas madre con dos cortes, plantas hijas con dos cortes), fueron llevados a campo julio (6750 plantas), el 98% han sobrevivido.



Figura 8. Siembra en campo del primer lote de semilla de plantas producidas y multiplicadas por la técnica SAH, cerca de los lotes de abaca. 2019

Medición cada mes de grosor y altura

En la (figura 9) se presenta el crecimiento de las plantas de yuca en el tiempo, en su desarrollo fenológico, se midió la altura (m), para determinar si se daban diferencias con el desarrollo con la estaca normal. Los resultados indican que si hay diferencias altamente significativas entre los tratamientos ($F=13,79$, $p<0,0001$), (cuadro 2, Anexo), con la técnica SAH se dio un menor crecimiento según las medias de Duncan y la que tuvo más crecimiento fue con la mini estaca de Cariari.

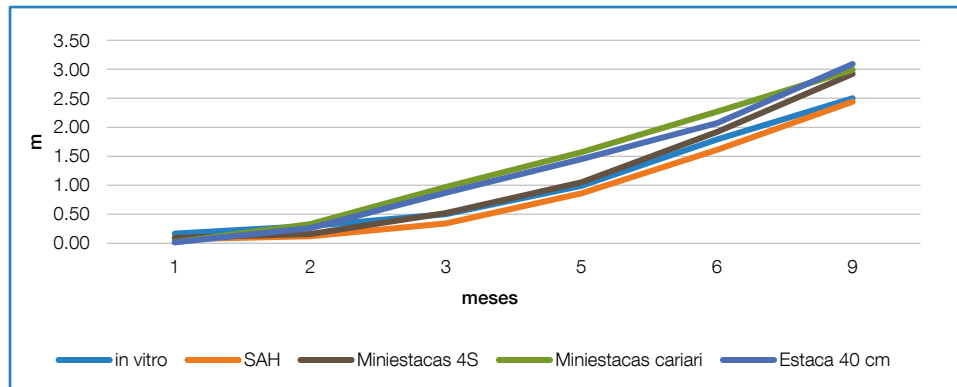


Figura 9. Comparación del crecimiento promedio de las plantas de yuca de su ciclo fenológico por la diferentes técnicas de propagación.

Con respecto al grosor del tallo de las plantas de yuca en su desarrollo fenológico se puede observar en la Figura 10. El análisis de varianza, también mostro diferencias altamente significativas ($F=18,65$, $p<0,0001$) (cuadro 3, Anexo), en este caso las plantas *in vitro* son menos gruesas que el resto y con la técnica SAH, alcanza el mismo grosor que la estaca normal. Lo cual podría representar una ventaja ya que la mayoría de los agricultores prefieren comprar la semilla de estaca normal.

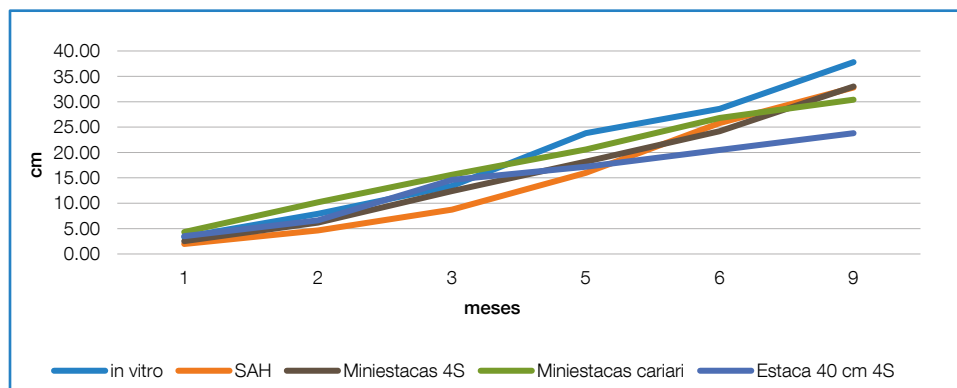


Figura 10. Comparación del promedio del grosor del tallo de yuca por diferentes técnicas de propagación a través de su ciclo fenológico.

Rendimiento

En el primer ensayo se comparó el número promedio de raíces y el peso promedio por planta con las diferentes técnicas de propagación (figura 11), en comparación con el testigo relativo (estaca normal de 40 cm). Los análisis de varianza (cuadro 4, Anexo) del peso de raíces por plantas, se dieron diferencias significativas ($F=2,84$, $p<0,0334$), las medias de Duncan indican que los tratamientos de *in vitro* y mini estacas de la estación tiene mayor producción que el resto de los tratamientos y tercer lugar con mayor rendimiento está la producción con SAH. En cuanto al número de raíces por planta (cuadro 5, Anexo) no se dan diferencias

significativas entre los tratamientos ($F= 0,84$, $p < 0,5043$). Normalmente se le indica a los agricultores que la primera producción con las plantas *in vitro* y ahora SAH, podría no tener un buen porcentaje en peso de raíces de primera calidad, porque es posible que las raíces por estar cierto tiempo entre el frasco y la bolsa, ellas se encuentren enrolladas, sin embargo, no se observó este problema en esta cosecha, la mayoría de las raíces estaban en óptimas condiciones (figura 12) y en todos los tratamientos se obtuvieron un promedio de cinco raíces por plantas, el máximo

de raíces que se encontraron en algunas plantas en todos los tratamientos fue de 10 raíces y las de menos producción fueron 3 raíces. Este ensayo fue cosechado a los 10 meses desde su siembra y posiblemente por ser plantas “nuevas tienen mucho vigor, así que se cosecharon raíces muy grandes de más de 3 kg, por lo que, para efectos comerciales, sería conveniente ir evaluando desde los 8 meses para tomar la decisión de cosechar antes y poder vender yuca de primera para para-finado de primera, que es lo mejor pagan a los agricultores.

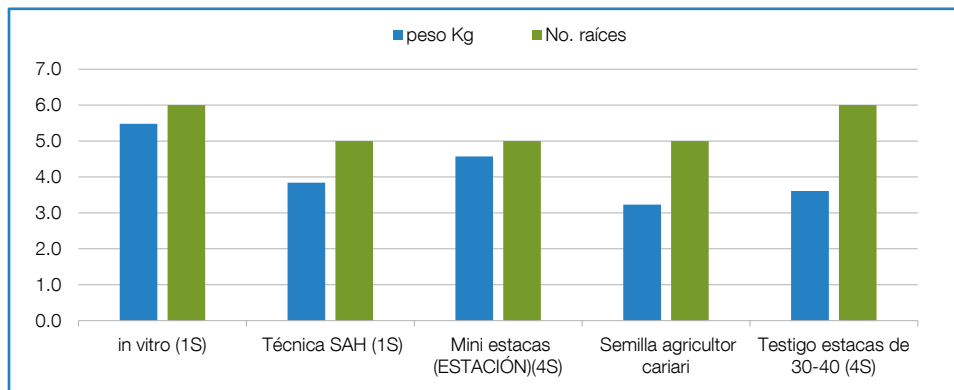


Figura 11. Comparación promedio de producción en peso y número de raíz.



Figura 12. Se observan plantas de yuca cosechada, con un buen número de raíces y grosor y sin pedúnculo.

Parcelas de validación de medición de rendimiento de plantas de yuca por diferentes técnicas de propagación

De la semilla obtenida del primer ensayo de comparación en el rendimiento de las diferentes técnicas de propagación, se dio seguimiento a un lote de validación con el fin evaluar el rendimiento de la semilla de yuca con las diferentes técnicas de propagación (figura 13) ya que es costumbre del agricultor, sembrar su semilla (n) cantidad de veces. Considerando que el INTA tiene lotes de semilla de yuca para la venta de estacas, es importante conocer los rendimientos en el tiempo de la semilla que se está produciendo.

Los resultados muestran que en número de raíces no hay diferencias significativas (Cuadro 6, Anexo), entre los tratamientos ($F=1,30$, $p<0,2734$). Con respecto al peso promedio de las raíces el análisis muestra que hay diferencias ($F=3,08$, $p<0,0185$) cuadro 7, Anexo), Duncan, marca que hubo más producción en el tratamiento *in vitro* S2 y SAH S2 y la de menor producción fue SAH2 S1, Se observa el peso promedio de plantas de cada tratamiento en dos años de evaluación, en el año 2020, la segunda siembra de *in vitro* y SAH es de mayor producción con respecto al testigo

relativo de la estaca de 40 cm. Con respecto a SAH2 S1, aquí la planta se llevó al campo ya más endurecida tenía 8 semanas de estar en el vivero. Se puede esperar que el rendimiento en los próximos años sea siempre mayor, pero conforme las plantas permanecen más en el campo, con el ataque de enfermedades tales como virus y bacterias y algunas plagas, es posible que este comportamiento haga que la producción vaya bajando, es por esa razón se le dará seguimiento a esta semilla, para ver su comportamiento de producción en el tiempo. También resultan muy interesantes los resultados de producción de las mini estacas, el rendimiento es muy bueno y con este método se puede aprovechar más la semilla que se tiene por el corte de 2 nudos por estaca, en el trabajo realizado por (Tumwegamire *et al.* 2017), ellos realizaron siembra de miniestacas y de múltiples brotes que salieron de las plantas de yuca e indican que la técnica ayudó a ahorrar tiempo y reducir los costos de adquisición y aclimatación y se aseguró de que hubiera suficientes esquejes de tallos y puede ser útil en la multiplicación de plantas endurecidos.

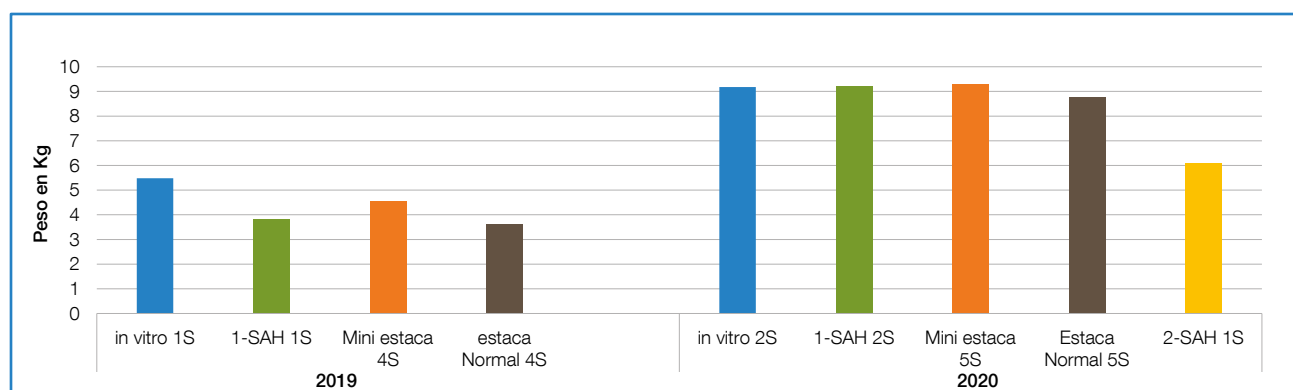


Figura 13. Peso promedio de raíces de yuca de cada tratamiento en dos años de seguimiento a la misma semilla.

CONCLUSIONES GENERALES

1. Las plántulas *in vitro* tienen que estar en óptimas condiciones para las siembras de SAH.
2. El corte de la planta *in vitro* se hará completa y se siembra todas las partes igualmente en la caja de SAH, ciertamente el crecimiento es un poco desigual, pero no es relevante, siempre y cuando se manejen agrónomicamente de manera regular.
3. Las plantas sembradas en las cajas de SAH, se llevan al cuarto de crecimiento y ahí permanecen cerradas todo el tiempo durante las 3-4 semanas de su estancia. En la fase del laboratorio se logró una sobrevivencia de un 98%.
4. El trasplante se hará directamente a bolsas grandes, estas serán las plantas madre, para en el tiempo realizar varios cortes,
5. Al trasplantar las plantas de la caja de SAH a la bolsa, colocar encima de la planta un vaso transparente para mantener el microclima que se tenía con la caja, dejarlo al menos una semana.
6. En el invernadero, las plantas permanecerán al menos 4-6 semanas y se les abonará con 2 gr de fertilizante 10-30-10 y aplicación de plaguicidas si fuera necesario, en esta fase se logró una sobrevivencia del 100% de las plantas.
7. Una vez en el vivero, las plantas deben estar al menos 6-8 semanas antes de ser llevadas a campo, para una mejor aclimatación y endurecimiento. Las mismas tendrán los cuidados de riego, fertilización y aplicación de plaguicidas para el combate de plantas y enfermedades. Aquí sobrevivió el 100% de las plantas
8. Las plantas *in vitro* y en multiplicación por SAH en comparación con la estaca normal, tiene un excelente desarrollo y su rendimiento es superior.
9. Se comprobó en el campo que las mini estacas de 2-3 nudos tienen un buen rendimiento y desarrollo, comparable con la estaca normal.
10. Se validó y dio seguimiento en el campo la segunda siembra de la semilla producida *in vitro*, con excelente rendimiento y producción de raíces, a los que se le espera dar seguimiento con sucesivas siembras en el tiempo, lográndose un 98% de plantas sobrevivientes en campo, y que allá estado en vivero al menos 6 semanas.

RECOMENDACIONES

Se debería darle seguimiento a la semilla de yuca que está produciendo y vendiendo el INTA por 10 años, con un manejo adecuado y regulado de manera estricta durante el tiempo de la cadena de desarrollo, recordar que el cambio de manejo puede afectar la calidad del material, con las diferentes siembras en el tiempo para medir

los rendimientos y ver cuando esta se empieza a degenerar a causa del ataque de plagas y enfermedades o por edad fenológica. Promover el uso extensivo de semilla limpia que cumpla con las necesidades del sector, con un manejo adecuado y tecnificado que fortalezca el material en desarrollo.

LITERATURA CITADA

- Acedo, ZV; Corazon, UL. 2008. Rapid propagation of released Philippine cassava varieties through tissue culture. *Journal of Root Crops*. 34(2):108–114.
- Ahloowalia, BS; Prakash, J; Savangikar, VA; Savangikar, C. 2004. Plant tissue culture. In *Blow cost options for tissue culture technology in developing countries*^ Proceedings of a Technical Meeting organized by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture held in Vienna, 26–30 August 2002”: 1–15. (Also available www.pubiaea.org/mgcd/publications/pdf/te_1384_web.pdf).
- Andrade-Bolaños, AJ; Mullo-Panoluisa, FE; Rojas-Olmedo, VN. 2017. Sistema de Inmersión Temporal en la propagación de minitubérculos semilla de papa. *Revista Latinoamericana de la Papa* 21 (2): 97 – 105.
- INEC (Instituto Nacional de Estadística y Censo). 2015. Censo Nacional Agropecuario VI. Instituto Nacional de Estadística y Censos. Mayo 2014. 146 p.
- FAO. 2007. Material de propagación de calidad declarada. Protocolos y normas para cultivos propagados vegetativamente. ED: J. Fajardo, N. Lualadio, M. Larinde, C. Rosell, I. Barker, W. Roca, E. Chujoy. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Roma, Italia. 133 g.
- Hanhineva, K; Kokko, H; Kaˆ Renlampi, S. 2005. Shoot regeneration from leaf explants of five strawberries (*Fragaria x Ananassa*) cultivars in temporary immersion bioreactor system. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*. 41:826–831.
- Mabanza, J; Rodriguez-Andriyaması, AV; Mahouka, J; Boumba, B. 1994. Evaluation of cleaned cassava varieties in Congo. In: *International Scientific Meeting on Cassava Biotechnology Network, 2., 1994, Bogor. Proceedings. Bogor Cassava Biotechnology Network*. p.194-201.
- Pedroso de Oliveira, R; Da Silva, T; Gomes, A; Duarte Vilarinhos, A. 2000. Avaliação de um sistema de micropropagação massal de variedades de mandioca Evaluation of a mass micro-propagation system of cassava varieties. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 35(12): 2329-2334.
- Riato, S; Gonzáles, A; Huarte, M. 2018. Sistema de producción de plántulas. Sistema autotrófico hidropónico. (1).pdf http://www.abbabata-brasileira.com.br/images/eventos/arquivos/Marcelo_Huarte
- Rigato, S; González, A; Huarte, M. 2001. Producción de plántulas por el sistema autotrófico-hidropónico. *Revista Latinoamericana de la Papa* 12 (1): 110 -120.
- Roca, WM.1984. Cassava. In: Sharp, WR.; Evans, DA.; Ammirato, PV.; Yamada, Y. (Ed.). *Handbook of plant cell culture: crop species*. New York: Mcmillan, 1984. p.269-301.
- Roosevelt, HE; Caicedo, E; Muñoz, L; Ríos, A; Azcárate, A; Dorado, C; Tohme, J. 2012. El cultivo in vitro: Otra manera de propagar la yuca. *Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Área de Investigación en Agrobiodiversidad*.X, 52 p. (Publicación CIAT no. 376) ISBN 978-958-694-111-2.
- Sessou, AF; Kahia, JW; Houngue, JA; Ateka, EM; Dadjo, C.; Ahanhango, C. 2020. In vitro propagation of three mosaic disease resistant cassava cultivars. *Biotecnología BMC*. 20 (51):1-13.
- Tumwegamire, S; Kanju, E; Legg, J; Shirima, R; Kombo, S; Mkamilo, G; Mtunda, K; Sichalwe, K; *et al.* 2018. Exchanging and managing in-vitro elite germplasm to combat Cassava Brown Streak Disease (CBSD) and Cassava Mosaic Disease (CMD) in Eastern and Southern Africa. *Food Security*.10:351–368
- Velásquez Carrera, J. 2018. Producción de tuberculo-semillas de papa en la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP y su relación con el sector semillero nacional. *INIAP. Estación Experimental Santa Catalina. Departamento de Producción de Semillas*. <http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/documentos/Producci%C3%B3n%20de%20tuberculosemilla%20de%20papa%20en%20la%20Estaci%C3%B3n%20Experimental%20Santa%20Catalina.pdf>

ANEXO

Cuadro 2. Análisis de la Varianza y medias de Duncan, comparando el crecimiento en altura de las plantas por diferentes técnicas de propagación, a través del ciclo fenológico.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	5465514,96	11	496865,00	272,97	<0,0001
Tratamiento	100369,35	4	25092,34	13,79	<0,0001
Fecha	5365090,99	7	766441,57	421,07	<0,0001
Error	1252314,57	688	1820,22		
Total	6717829,53	699			

Test:Duncan Alfa=0,05

Tratamiento	Medias	n	E.E.			
SAH	71,27	140	3,81	A		
Miniestaca4S	90,44	140	3,80		B	
In vitro	91,21	140	3,80		B	
Estaca 40cm	96,95	140	3,81		B	
Mini estaca ca	108,14	140	3,80			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Cuadro 3. Análisis de la Varianza y medias de Duncan, comparando el grosor de las plantas por diferentes técnicas de propagación, a través del ciclo fenológico.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	67180,48	11	6107,32	337,33	<0,0001
Tratamiento	1350,35	4	337,59	18,65	<0,0001
Fecha	65828,88	7	9404,13	519,42	<0,0001
Error	12456,28	688	18,11		
Total	79636,76	699			

Test:Duncan Alfa=0,05

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
SAH	12,53	140	0,38	A
Estacas 40cm	12,74	140	0,38	A
Miniestaca 4S	13,74	140	0,38	B
Miniestaca ca	14,48	140	0,38	B
In vitro	16,37	140	0,38	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Cuadro 4. Análisis de la Varianza y medías de Duncan, comparando el Peso de las raíces de yucas entre tratamientos.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	38,25	4	9,56	2,82	0,0334
TRATAMIENTO	38,25	4	9,56	2,82	0,0334
Error	186,29	55	3,39		
Total	224,54	59			

Test:Duncan Alfa=0,05

TRATAMIENTO	Medias	n	E.E.		
Miniestaca car	3,23	12	0,53	A	
Estacas 40cm	3,61	12	0,53	A	
SAH	3,83	12	0,53	A	
Miniestacas 4S	4,57	12	0,53	A	B
In vitro	5,48	12	0,53	B	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Cuadro 5. Análisis de la Varianza y medías de Duncan, comparando el Peso de las raíces de yucas entre tratamientos.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	12,10	4	3,03	0,84	0,5043
TRATAMIENTO	12,10	4	3,03	0,84	0,5043
Error	197,50	55	3,59		
Total	209,60	59			

Test:Duncan Alfa=0,05

TRATAMIENTO	Medias	n	E.E.		
Miniestaca 4S	4,67	12	0,55	A	
SAH	4,92	12	0,55	A	
Miniestaca car	5,00	12	0,55	A	
Estacas 40 cm	5,50	12	0,55	A	
In vitro	5,92	12	0,55	A	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Cuadro 6. Análisis de la Varianza del número de raíces por planta entre los tratamientos y Medías de Duncan

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	137,76	36	3,83	0,57	0,9738
tratamiento	34,95	4	8,74	1,30	0,2734
planta	102,81	32	3,21	0,48	0,9913
Error	859,85	128	6,72		
Total	997,61	164			

Test:Duncan Alfa=0,05

tratamiento	Medias	n	E.E.		
SAH2	S1	5,91	33	0,45	A
Miniestacas S5	6,64	33	0,45	A	B
Estacas 40cm S5	6,67	33	0,45	A	B
SAH S2	6,67	33	0,45	A	B
In vitro S2	7,36	33	0,45	B	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Cuadro 7. Análisis de la Varianza comparando el peso de raíces por planta entre los tratamientos y Medias de Duncan

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	769,86	36	21,38	0,82	0,7477
tratamiento	320,46	4	80,11	3,08	0,0185
planta	449,40	32	14,04	0,54	0,9775
Error	3328,92	128	26,01		
Total	4098,78	164			

Test:Duncan Alfa=0,05

tratamiento	Medias	n	E.E.		
SAH2 S1	6,10	33	0,89	A	
Estaca S5	7,88	33	0,89	A	B
Miniestaca S5	8,52	33	0,89	A	B
In vitro S2	9,70	33	0,89	B	
SAH S2	9,96	33	0,89	B	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

VARIACIÓN DEL CARBONO ORGÁNICO DEL SUELO POR LA INTRODUCCIÓN DE BRACHIARIA EN DOS REGIONES DE COSTA RICA

Johnny Montenegro¹, Eduardo. Barrantes²

RESUMEN

Variación del carbono orgánico del suelo por la introducción de brachiaria en dos regiones de Costa Rica. La captura y almacenamiento de carbono orgánico en el suelo (COS) bajo pasturas está recibiendo mucha atención como opción de mitigación. En concordancia con lo anterior se cuantificó, en el trópico seco y en el trópico húmedo de Costa Rica, el carbono orgánico de un suelo cubierto por *Brachiaria* con diferente edad de establecimiento, se comparó con el determinado bajo una pastura natural, y se determinaron los cambios producidos en el tiempo por la sustitución de la pastura natural. Para estudiar la dinámica temporal del COS en un sitio del trópico húmedo de Guápiles se evaluó pasto natural (T0) y *Brachiaria* con 7 (T7) y 11 (T11) años de establecida; en Atenas, trópico seco, se evaluó además del natural (T0), 3 y 15 (T3 y T15) años de establecida la brachiaria. En cada sitio, para cada pastura y edad de establecimiento, se seleccionaron tres repeticiones, de donde se obtuvieron muestras de suelo hasta 60 y 50 cm de profundidad, respectivamente, y se implementó un diseño irrestricto al azar con tres tratamientos y tres repeticiones. En cada localidad, el COS (kg C t^{-1} de suelo) fue similar ($P > 0,05$) entre las edades de establecimiento de la gramínea mejorada y la natural, aunque la cantidad varió con la profundidad ($P < 0,0001$), y se determinó correlación lineal positiva ($P < 0,001$) con el contenido de N del suelo. En Atenas, el COS presentó correlación lineal negativa ($P < 0,0001$) con el contenido de arcilla. En ambos sitios fue clara la tendencia al incremento del COS con el tiempo del establecimiento de la gramínea mejorada, luego de una reducción inicial, mostrando el efecto benéfico de la introducción de las especies mejoradas.

Palabras clave: Brachiaria, cambio climático, gases con efecto invernadero, ganadería tropical, mitigación.

ABSTRACT

The capture and storage of soil organic carbon (SOC) under pastures is receiving a lot of attention as a mitigation option. Therefore, the objectives were to quantify in the dry and humid tropics of Costa Rica, the soil carbon under *Brachiaria* grass with different age of establishment, to compare it with that determined under a natural pasture, and to determine if there are changes in it along the time with the substitution of natural pasture. To study the temporal dynamics of SOC in the humid tropic of Guápiles, a place with natural grass (T0), and *Brachiaria* with 7 (T7) and 11 (T11) years of establishment was selected; while in the dry tropic of Atenas in addition to the natural grass (T0), were evaluated 3 and 15 (T3 and T15)

1 Investigador en Cambio climático y Agricultura, Convenio Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA) – Instituto Meteorológico Nacional (IMN), Costa Rica, email: jmontenegro@inta.go.cr / jmontenegro@imn.ac.cr; ORCID: 0000-0001-8526-570X.

2 Director, Dirección de Investigación y Transferencia, Universidad Técnica Nacional - Sede Atenas. Teléfono (506) 2455-1004, ORCID: 0000-0002-0383-3388.

years after the brachiaria was established. In each site, for each pasture and age of establishment, three replications were selected, from which the soil samples up to 60 and 50 cm deep were obtained, respectively, and a randomized unrestricted design with three treatments and three replications was implemented. In each locality, the SOC (kg C t^{-1} of soil) was similar ($P > 0.05$) between the ages of establishment of the improved and natural grass, although the amount varied with depth ($P < 0.0001$), and a positive linear correlation ($P < 0.001$) with soil N content was determined. In Atenas, SOC presented a negative linear correlation ($P < 0.0001$) with soil clay content. In both places there was a clear tendency to increase the SOC with the time of establishment of the improved grass, after an initial reduction, showing the beneficial effect of the introduction of the improved species.

Key words: Brachiaria, climate change, greenhouse gases, mitigation, tropical cattle.

INTRODUCCIÓN

La captura y almacenamiento de carbono orgánico en el suelo (COS) bajo sistemas de producción ganaderos es un servicio ecosistémico de las pasturas, y actualmente está recibiendo mucha atención ya que se puede constituir una importante opción de mitigación (Conant *et al.* 2001; Acharya *et al.* 2012). Se estima que los suelos bajo pasturas contienen al menos el 20% de todo el carbono del suelo terrestre y tienen el potencial de almacenar mayor cantidad que los suelos agrícolas (Liebig *et al.* 2010; McSherry y Ritchie 2013).

Debido a que el suelo es el más grande reservorio de carbono de los ecosistemas terrestres, tan solo el incremento del 5% en el tamaño de ese depósito, lo cual puede ser logrado con técnicas de manejo, tiene el potencial de reducir la cantidad de carbono atmosférico hasta en 16% (Baldock 2007). Se estima que el 89% de la mitigación potencial de los gases con efecto invernadero del sector agrícola se puede lograr mediante el secuestro de carbono en el suelo (Smith *et al.* 2008).

El incremento del COS es el resultado del carbono que ingresa mediante la fotosíntesis de las plantas, menos el que se libera por la respiración microbiana durante el proceso de descomposición de la materia orgánica. Si el carbono que se incorpora es mayor al respirado, se incrementa el contenido de este en el suelo.

De acuerdo con lo anterior, cuando ocurre un cambio en la cobertura del suelo y esta produce mayor cantidad de biomasa, muy probablemente también se incrementa el COS. Esta situación se

podría estar presentando en el caso de las pasturas cuando especies naturales de poca producción son reemplazadas por especies mejoradas con gran potencial productivo de biomasa.

En concordancia con lo anterior, evaluaciones realizadas por Costa *et al.* (2016) en Brasil determinaron en un perfil de 1,10 m de profundidad, que suelos bajo pasturas de *Brachiaria* presentaron incrementos de COS del orden de $0,56 \text{ t ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ comparados con la cobertura de vegetación natural que era la dominante previo al establecimiento de la gramínea.

Por su parte Assad *et al.* (2013) determinaron incrementos de COS entre 0-30 cm de profundidad, cuando compararon los valores de la vegetación nativa con aquellos detectados en suelos con años de haber sido convertidos a pasturas del género *Brachiaria*. La misma tendencia fue reportada por Eclisa *et al.* (2012) en Sur América.

Pasturas bien manejadas o mejoradas, tienen potencial de secuestrar carbono en el suelo. En este sentido, Maia *et al.* (2009) determinaron el potencial para secuestrar o emitir carbono a la atmósfera mediante el manejo de pasturas, y detectaron que las degradadas disminuyeron las reservas del suelo en aproximadamente $0,27\text{-}0,28 \text{ t C ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$; un mejor manejo de las pasturas mediante un régimen de pastoreo más técnico disminuyó el carbono del suelo a una menor tasa ($0,03 \text{ t C ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$), mientras que este mismo manejo en otros tipos de suelo y el manejo mejorado aumentaron las existencias en $0,72 \text{ t}$ y $0,61 \text{ t C ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$, respectivamente.

Lo anterior es concordante con lo reportado por Braz *et al.* (2013) en los Cerrados del Brasil.

Por lo anteriormente expuesto es que se hace necesario cuantificar no solo el contenido de carbono en el perfil del suelo, sino también determinar si se está produciendo algún cambio en la cantidad de carbono en el tiempo. De manera que, si se asocia la dirección del cambio detectado en la cantidad de carbono orgánico del suelo con el manejo o práctica implementada, se podrían identificar aquellas que contribuyen con el mantenimiento, incremento o disminución del COS, lo cual

es de suma importancia para la sostenibilidad del sistema de producción.

Basado en lo anterior los objetivos de esta investigación fueron: cuantificar en un sitio del trópico seco y otro en el trópico húmedo de Costa Rica, el carbono de un suelo cubierto por pasto *Brachiaria* con diferente edad de establecimiento; en cada región, comparar los valores de COS bajo la pastura mejorada con los de una pastura natural y, determinar si se han producido cambios en el tiempo en los valores de COS por la sustitución de la pastura natural por la especie mejorada.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación

Se seleccionaron dos fincas para implementar los muestreos; una de ellas es la Estación Experimental Los Diamantes (10°12' Latitud norte, 83°46' Longitud oeste) en Guápiles, Costa Rica, con un suelo Inceptisol, Suborden Udepts con textura franco arenoso, y a 260 m s.n.m.. Esta finca pertenece al Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA) Costa Rica. Esta región se clasifica como Bosque muy Húmedo Tropical (Holdridge 2000) y se caracteriza por tener temperatura y precipitación promedio anual de 26°C y 4.200 mm, respectivamente.

La otra finca se ubica en el Pacífico Central del país, en la provincia de Alajuela, cantón de Atenas (9°56' Latitud norte, 84°22' Longitud oeste). La finca pertenece a la Universidad Técnica Nacional (UTN), está a 450 m s.n.m., con 26°C de temperatura y 1.600 mm de precipitación promedio anual, y se encuentra en la zona de vida clasificada como Bosque Seco Tropical (Holdridge 2000). El suelo es un Entisol, Suborden Orthents, con textura arcillosa.

Las pasturas

En ambas fincas muestreadas las pasturas consideradas no reciben fertilización química, y se manejan en un sistema de pastoreo rotacional con bovinos de carne. En ellas el control de las malezas se realiza de manera manual cuando es necesario.

Muestreo de suelo

En ambas regiones se seleccionaron parcelas con pasto del género *Brachiaria*. En el caso de Guápiles se incluyó la *B. brizanta* cv Marandú y un híbrido de este género conocido como Cayman. También se muestreó el suelo bajo la especie naturalizada denominada ratana (*Ischaemum indicum*). En Atenas el comparador es una gramínea natural dominada por el género *Axonopus*, siendo la especie mejorada la *B. brizantha* cv Marandú.

Para ambos sitios las especies naturales fueron consideradas como testigo, debido a que fueron las pasturas existentes en los sitios donde se estableció la especie mejorada.

Tratamientos y variables evaluadas

En Guápiles se evaluaron tres tratamientos (edades de establecimiento de las pasturas):

1. Pastura de ratana (*Ischaemun indicum*) con más de 20 años de establecida (testigo, T0).
2. Siete años de establecida la pastura de *B. brizantha* cv Cayman (T7).
3. 11 años de establecida la pastura de *B. brizantha* cv Marandú (T11).

Con respecto al sitio muestreado en Atenas, los tratamientos (edades de establecidas las pasturas) fueron:

1. Pastura natural (*Axonopus* spp) con más de 20 años de establecida (T0).
2. Tres años de establecida la pastura de *B. brizantha* cv Marandú (T3).
3. 15 años de establecida la pastura de *B. brizantha* cv Marandú (T15).

En cada sitio, para cada pastura y edad de establecimiento, se seleccionaron tres parcelas o repeticiones, las cuales estaban separadas 20 m, en donde se obtuvieron las muestras de suelo. En ambas fincas muestreadas, las especies referenciadas representaron más del 95% de la biomasa disponible.

Las variables evaluadas fueron: contenido de carbono (kg t^{-1} suelo) y, % de nitrógeno.

En cada finca, la estrategia utilizada para estudiar la dinámica temporal del carbono del suelo fue una cronosecuencia, que consiste en evaluar áreas con diferentes períodos de establecimiento de la pastura mejorada ubicadas en similar condición de suelo, clima, y topografía.

Manejo de muestras

Las muestras de suelo recolectadas en el campo se clasificaron de acuerdo con la profundidad, dividiéndose en secciones de 10 cm hasta la máxima profundidad a la que se pudo introducir el barreno. El muestreo se realizó con un equipo Eijkelkamp provisto de un barreno cilíndrico diseñado para tomar muestras de suelo no

disturbadas. La profundidad de muestreo varió en función de las características propias del suelo donde se realizaron los muestreos.

En las pasturas ubicadas en la Estación Experimental Los Diamantes la profundidad de muestreo fue de 60 cm; no fue posible mayor exploración del perfil debido a la existencia de una capa rocosa que se ubica entre 50 y 70 cm de profundidad, y en consecuencia ello impidió la penetración del barreno.

En el caso de la UTN, la profundidad de muestreo fue 50 cm, la presencia de una capa de suelo arcilloso, sumamente compactada ubicada entre 50 y 60 cm de profundidad imposibilitó la introducción del barreno a mayores profundidades.

Las muestras de suelo se depositaron en una bolsa plástica identificada y se enviaron al Laboratorio de Suelos del INTA Costa Rica.

Análisis de laboratorio

A las muestras de suelo se les determinó: densidad aparente por el método del cilindro, carbono y nitrógeno mediante combustión seca de Dumas, y textura por el método de Bouyucos.

Cálculo de carbono

Como primer paso en el cálculo del contenido de carbono, se hizo la corrección a masa equivalente de suelo (MES), para lo cual se utilizó la siguiente ecuación (Livestock Environmental Assessment and Performance 2018):

$$\text{MES} = \frac{\sum \text{Ma}}{\sum \text{Va}} * t_i * 100 \quad \text{Ec. 1,}$$

Donde:

- MES (t suelo ha^{-1}) es la masa equivalente de suelo (se utilizará en la ecuación 3),
- $\sum \text{Ma}$ es la suma de las masas de las muestras agrupadas,
- $\sum \text{Va}$ es la suma de los volúmenes de las muestras agrupadas,
- t_i (cm) corresponde a la profundidad del muestreo aplicado.

El contenido de carbono en el suelo se calculó de acuerdo con la ecuación 2, como sigue:

$$\text{COS (t C ha}^{-1}\text{)} = \text{CO}_i * \text{P}_i * \text{densidad } i \text{ Ec. 2,}$$

Donde:

- COS (t C ha⁻¹): es la cantidad de carbono orgánico del suelo,
- CO_i (mg C g⁻¹ suelo): es el contenido de carbono orgánico presente en la muestra *i*,
- P_i (cm): es la profundidad a la que se tomó la muestra *i*,
- Densidad (g cm⁻³): es la Densidad Aparente de la muestra *i*.

Finalmente, se calculó el contenido de carbono orgánico del suelo por tonelada de suelo de acuerdo con la ecuación 3, en la cual se utilizan los valores calculados en las ecuaciones 1 y 2:

$$\begin{aligned} \text{COS (kg C t}^{-1}\text{ suelo): COS (t C ha}^{-1}\text{) /} \\ \text{MES (t de suelo ha}^{-1}\text{) * 1.000 Ec. 3,} \end{aligned}$$

Donde:

- COS (kg C t⁻¹ suelo): cantidad de carbono orgánico por tonelada de suelo,
- COS (t C ha⁻¹): cantidad de carbono orgánico del suelo, (Ec. 2)
- MES (t de suelo ha⁻¹): masa equivalente de suelo (Ec. 1).

Análisis estadístico

En cada sitio se implementó un diseño irrestricto al azar con tres tratamientos y tres repeticiones. Se realizó un análisis de contrastes ortogonales, y mediante un ANDEVA y la prueba de Tuckey al 5% se efectuó la comparación de medias en InfoStat (DiRienzo *et al.* 2018).

RESULTADOS

Estación Experimental Los Diamantes

Distribución del carbono orgánico en el perfil evaluado

La cantidad de carbono del suelo varió con la profundidad (P<0,0001), observándose los mayores valores en la parte superficial del suelo y los menores en la sección más profunda (Cuadro 1).

La incorporación sobre la superficie del suelo de parte de la biomasa aérea producida, así como la constante reposición de la biomasa radical que se localiza mayoritariamente en las capas más superficiales del suelo, que se produce como resultado de la mortalidad de estas luego de los pastoreos, contribuye a explicar los mayores valores de COS en los estratos superficiales (Andrade *et al.* 2014; Rumpel y Kögel-Knabner 2011).

Cuadro 1. Carbono orgánico, kg t⁻¹ suelo, según profundidad en un suelo con gramíneas. Guápiles, Costa Rica.

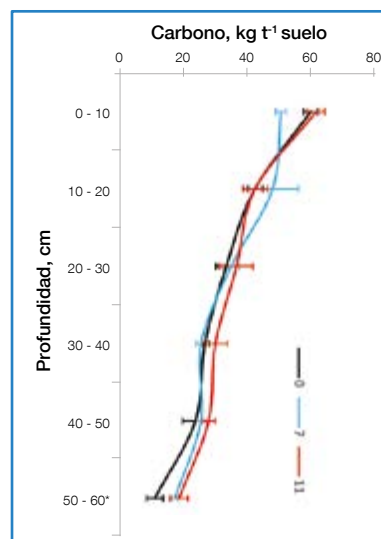
Profundidad, cm	Carbono, kg t ⁻¹ suelo
0 – 10	57,9±2,1 ^a
10 – 20	44,6±2,8 ^b
20 – 30	35,3±1,9 ^c
30 – 40	27,7±1,4 ^{cd}
40 – 50	25,9±1,5 ^d
50 – 60	15,8±1,7 ^e
0 - 30	45,6±2,2 ^a
30 - 60	23,1±1,3 ^b
0 - 60	34,5±2,9

Valores promedio ± 1 error estándar (EE) con diferente letra difieren al nivel P<0,05

La distribución del carbono orgánico en el perfil del suelo explorado muestra dos situaciones bien definidas. Coincidentemente con lo reportado en la literatura (Paz y Etchevers 2016), la primera es la tendencia clara a disminuir el carbono con la profundidad, determinándose en promedio un contenido menor del 50% a partir de los 30 cm de profundidad con respecto al determinado en la capa superficial de 0 a 10 cm (figura 1).

La segunda es que, con la excepción del estrato más superficial, el contenido de carbono orgánico tiende a ser mayor con la especie mejorada en T11. Las raíces de la especie mejorada logran crecer a mayores profundidades que las de ratana y ello se manifiesta en mayor contenido de carbono a partir de los 20 cm de profundidad (figura 1). Esta condición ha sido mencionada por (Pérez *et al.* 2019) quienes al comparar la cantidad de carbono en el suelo bajo especies de gramíneas mejoradas determinaron mayores niveles de COS con respecto a aquel determinado bajo pasturas naturales.

La ratana es una especie muy agresiva que cubre el 100% del suelo y presenta gran masa radicular la cual se localiza muy superficial (Villalobos 2010). Este hecho probablemente influye positivamente para que esta especie tenga la cantidad de carbono observada en esta evaluación en la capa más superficial del suelo. Ello también explica la menor cantidad de carbono en capas de suelo más profundas tal y como se observa en la especie mejorada (figura 1).



0: testigo; 7, 11: años de establecida la pastura mejorada.

Valores promedio \pm 1 EE

Figura 1. Distribución de carbono orgánico en el perfil de un suelo cubierto por *Brachiaria* con diferente edad de establecimiento. Guápiles, Costa Rica.

También se determinaron diferencias ($P < 0,0001$) en el contenido de carbono a lo profundo del perfil en cada tratamiento, y a pesar de que no se determinó interacción significativa tratamiento*profundidad (Cuadro 2), el comportamiento del COS puede agruparse, de acuerdo con la tendencia observada, en tres categorías: 1.- reducción del COS luego del establecimiento de la pastura e incremento posterior a los siete años (0-10 cm); 2.- incremento del COS desde el establecimiento y hasta los siete años, posterior a lo cual disminuyó (10-20 cm), y 3.- incremento continuo del COS constituido por las capas más profundas (Cuadro 2).

Cuadro 2. COS, kg t^{-1} suelo, según profundidad y años de establecido el pasto *Brachiaria*. Guápiles, Costa Rica.

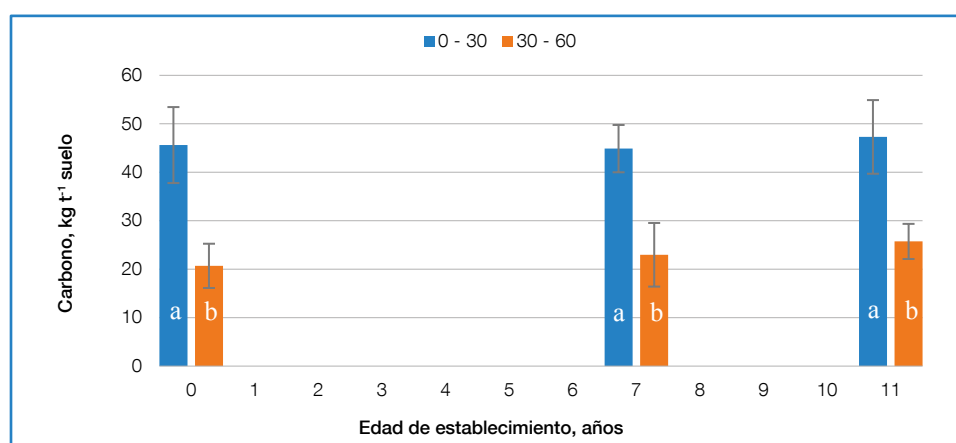
Tratamiento	T0	T7	T11
		Carbono,	
Profundidad, cm		kg t⁻¹ suelo	
0 - 10	60,4 \pm 2,3 ^a	51,0 \pm 1,7 ^a	62,1 \pm 2,7 ^a
10 - 20	42,7 \pm 2,3 ^b	48,4 \pm 8,2 ^a	42,8 \pm 3,8 ^b
20 - 30	33,7 \pm 3,2 ^{bc}	35,2 \pm 2,5 ^{ab}	37,0 \pm 5,1 ^{bc}
30 - 40	26,9 \pm 1,1 ^c	25,7 \pm 1,4 ^{bc}	30,3 \pm 3,8 ^{cd}
40 - 50	24,0 \pm 4,0 ^{ec}	25,7 \pm 1,4 ^{bc}	28,1 \pm 2,0 ^d
50 - 60	11,1 \pm 2,7 ^d	17,5 \pm 1,2 ^c	18,8 \pm 2,8 ^e

Promedio \pm 1 EE en cada tratamiento con diferente letra difieren al nivel $P < 0,05$

La tendencia observada en el incremento de COS parece ser el resultado del aporte de carbono que realizan las raíces de la *Brachiaria*, mostrando el beneficio de esta especie que entre sus características está la de presentar raíces largas que pueden explorar capas profundas del suelo (Pérez *et al.* 2019), lo cual le permite acceder más agua y nutrientes y con ello logra producir mayores niveles de biomasa que las especies naturales.

Carbono por unidad de suelo según edad de establecimiento

No se determinaron diferencias ($P>0,05$) a lo largo del tiempo de establecimiento, tanto para la capa superficial de 0–30 cm, como en la más profunda (30–60 cm) del perfil evaluado (figura 2), aunque en ambas profundidades existe tendencia al incremento del COS con la edad de establecida la pastura mejorada.



Valores promedio \pm 1 EE con diferente letra difieren al nivel $P<0,05$ 0-30, 30-60: profundidad en cm

Figura 2. COS en el perfil del suelo (0–60 cm) en función del tiempo de establecido el pasto *Brachiaria*. Guápiles, Costa Rica.

Cambio en la cantidad de carbono por unidad de suelo

En los primeros 30 cm del suelo y hasta el séptimo año del establecimiento de la brizantha, en promedio la tendencia muestra que el carbono disminuyó $0,11 \text{ kg t}^{-1}$ suelo (Cuadro 3). Sin embargo, cuando se considera en su totalidad el tiempo desde la siembra, el COS tiende a incrementarse $0,15 \text{ kg t}^{-1}$ suelo (Cuadro 3). Incrementos en la cantidad de carbono en el suelo por la introducción de especies de gramíneas mejoradas ha sido reportada por Arguedas *et al.* (2020) en Costa Rica. De igual manera, estos resultados son coincidentes con los mostrados por Assad *et al.* (2013) y Costa *et al.* (2016) en Brasil y por Eclisa *et al.* (2012) en tres países de Sur América.

La situación es diferente cuando se considera la mayor profundidad, ya que independientemente de la edad de plantada (T7 y T11) el suelo bajo la especie mejorada presenta tendencia al

incremento del COS (Cuadro 3) en cantidades que hacen que el perfil completo evaluado (0–60 cm) presente valores positivos, es decir, se incrementan los valores del COS.

Cuadro 3. Cambio promedio anual en el COS según profundidad y años de establecida la *Brachiaria*. Guápiles, Costa Rica.

	Profundidad cm		
	0-30	30-60	0-60
Promedio anual	kg C t ⁻¹ suelo		
T7	$-0,11 \pm 0,60$	$0,33 \pm 0,39$	$0,11 \pm 0,49$
T11	$0,15 \pm 0,42$	$0,46 \pm 0,39$	$0,31 \pm 0,40$

Valores promedio \pm 1 EE

Esto pone de manifiesto la importancia de realizar los muestreos de suelo a profundidades mayores que 30 cm cuando se determine COS, ya que se podría estar dejando de contabilizar cambios en la cantidad de carbono que estarían ocurriendo, lo cual es el resultado del crecimiento de raíces y los exudados de estas (Pérez *et al.* 2019).

Relación Carbono:Nitrógeno del suelo

La relación carbono:nitrógeno (C/N) del suelo fue similar entre las diferentes edades de establecida la gramínea mejorada (T7 y T11) y la pastura natural (T0, Figura 3), con valores cercanos a 10 en la parte superficial del perfil, los cuales se incrementan ligeramente con la profundidad. También se observó tendencia a incrementarse los valores con la edad de establecimiento (T11, Figura 3).

Se determinó correlación lineal positiva ($P < 0,001$) entre el contenido de nitrógeno y de carbono del suelo (figura 4), lo cual pone de manifiesto la importancia del nitrógeno para incrementar la tasa de fijación de carbono en el suelo, tal y como fuera establecido por Fisher *et al.* (1995).

Es claro que conforme existe más nitrógeno en el suelo se incrementa el crecimiento de las

pasturas, lo cual es de gran importancia no solo porque se aumenta la disponibilidad del forraje, sino también porque existe mayor cantidad de material vegetal que se incorpora al suelo, tanto a nivel superficial como bajo la superficie. Es por esta razón que una de las recomendaciones en pasturas tropicales es la introducción de leguminosas para incrementar la disponibilidad del nitrógeno en el suelo y con ello la producción de forraje y también la fijación de carbono en el suelo (Fisher *et al.* 1995).

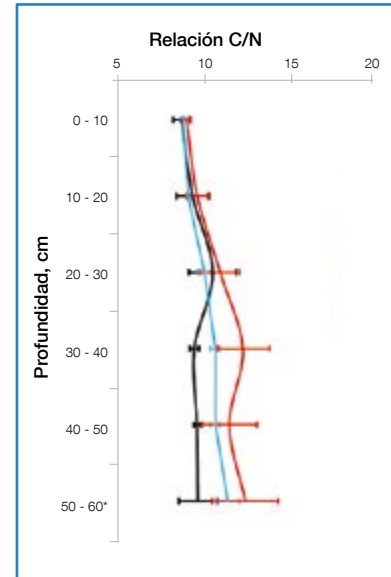


Figura 3. Relación C/N en el perfil del suelo (0-60 cm) bajo *Brachiaria* con diferente tiempo de establecida. Guápiles, Costa Rica.

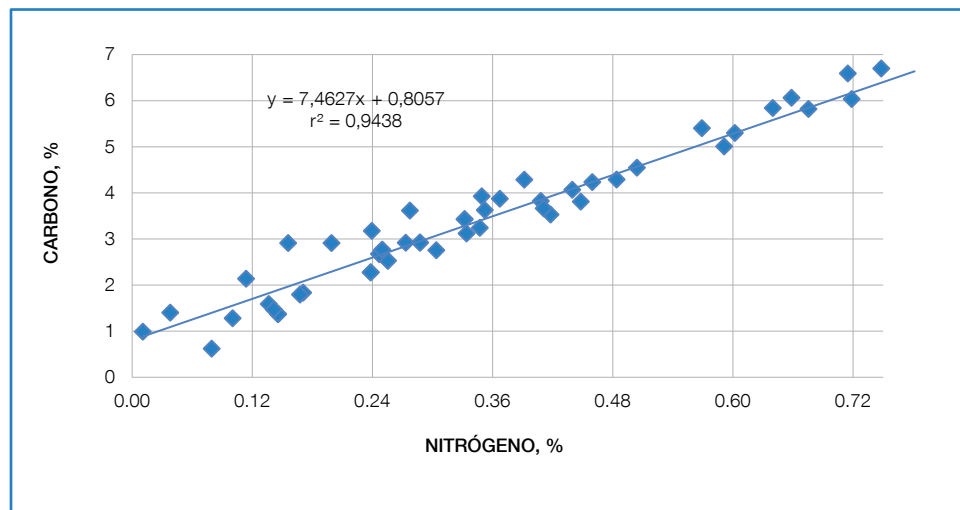


Figura 4. Relación entre nitrógeno y carbono de un suelo bajo pastura natural y de *Brachiaria*. Guápiles, Costa Rica.

Atenas

Cantidad de carbono por unidad de suelo

La cantidad de COS varió ($P < 0,0001$) con la profundidad. Los mayores valores por unidad de suelo se determinaron en la parte más superficial del perfil, y los menores en las secciones más profundas; valores intermedios se detectaron en las restantes capas de suelo (Cuadro 4).

De igual forma, cuando se agrupa el COS por profundidad del suelo, en la parte superior (0–30 cm) se determinó el mayor ($P < 0,0001$) contenido de carbono por unidad de suelo con respecto al detectado a mayor profundidad (30–50 cm, Cuadro 4).

Cuadro 4. Carbono orgánico, kg t^{-1} suelo, según profundidad en un suelo con *Brachiaria*. Atenas, Costa Rica.

Profundidad, cm	Carbono, kg t^{-1} suelo
0 – 10	50,9±2,4 ^a
10 – 20	34,4±2,5 ^b
20 – 30	29,5±3,5 ^{bc}
30 – 40	20,8±2,7 ^c
40 – 50	18,7±2,6 ^c
0 - 30	38,3±2,4 ^a
30 - 50	19,8±2,6 ^b

Valores promedio \pm 1 EE con diferente letra difieren al nivel $P < 0,05$

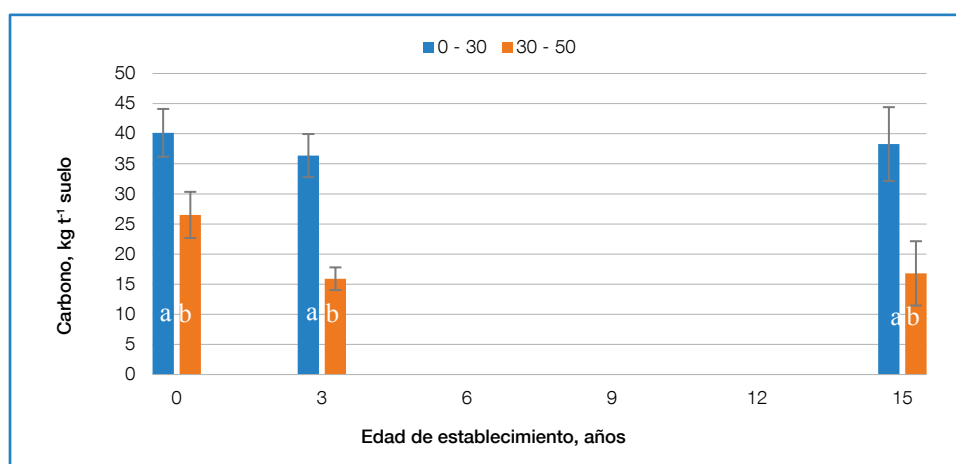


Figura 5. Contenido de carbono orgánico, kg t^{-1} suelo, de un suelo bajo *Brachiaria* según profundidad y edad de establecimiento. Atenas, Costa Rica.

La constante incorporación de material vegetal sobre la superficie del suelo, así como también el incorporado por la renovación de raíces y los exudados de estas (Andrade *et al.* 2014; Rumpel y Kögel-Knabner 2011) que se localizan mayoritariamente en los primeros 30 cm del suelo, favorecen la acumulación del carbono a esa profundidad.

Por otra parte, aunque no se detectaron diferencias entre tratamientos en el contenido de COS con el tiempo de establecimiento a una misma profundidad (0–30 cm ó 30 – 50 cm), se nota la tendencia a la reducción de carbono en ambas profundidades tres años después de establecida la gramínea, lo cual es más marcado entre los 30 y 50 cm (figura 5).

Ello probablemente refleja el efecto negativo de la preparación del suelo para el establecimiento de la gramínea mejorada, ya que al arar el suelo se expone materia orgánica a condiciones propicias para que ocurra su descomposición, lo cual conlleva a la disminución de esta (Hernández y López 2002; Sotomayor-Ramírez *et al.* 2007).

Sin embargo, lo interesante es que, con el paso del tiempo, dada la producción e incorporación al suelo de biomasa aérea y radicular, a partir de los tres años la tendencia cambia y se incrementa el contenido de carbono a valores similares que los observados bajo la pastura natural (T0), evidenciando la fijación de carbono causado por esta gramínea mejorada (figura 5). La tendencia es la misma en la parte más profunda del perfil evaluado.

Ello pone de manifiesto que esta gramínea mejorada, bajo las condiciones agroecológicas donde se plantó y debido al manejo de la misma, puede reponer el carbono del suelo, al menos a su condición original previo a su siembra, pero para ello se requiere un período relativamente largo desde su establecimiento debido a las condiciones climáticas de esta región donde se

presentan alrededor de seis meses sin lluvias. Es por ello que sería prudente utilizar otros métodos de siembra, como por ejemplo mínima labranza, para causar menor alteración de las condiciones del suelo y así no favorecer la rápida mineralización de la materia orgánica durante el proceso de siembra y con ello reducir la pérdida de carbono del suelo (Espinoza 2010).

Al analizar las tendencias del COS en el perfil superior (0–30cm) pero en tractos de 10cm, se pudo observar como la capa más superficial (0–10cm) muestra dos situaciones claras. La primera es que el contenido de COS es superior ($P < 0,0001$) con relación a las observadas en las dos restantes capas de suelo. La segunda es que el valor de COS se incrementó a los tres años de establecimiento, mostrando equilibrio posteriormente (figura 6).

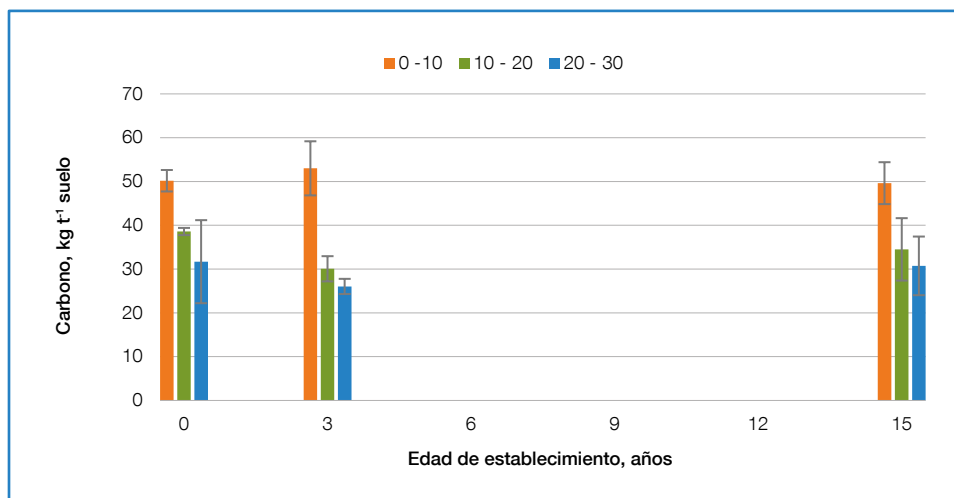


Figura 6. Contenido de carbono orgánico, kg t⁻¹ suelo, en los primeros 30 cm de profundidad de un suelo bajo *Brachiaria* según edad de establecimiento. Atenas, Costa Rica.

Por el contrario, las otras dos capas de suelo (10–20 y 20–30 cm) mostraron reducción de COS al tercer año de establecida la pastura mejorada.

Esta diferencia de comportamiento podría estar señalando la incorporación de biomasa aérea en la capa más superficial de suelo que contribuyó para que los niveles de COS se incrementaran durante esos años (Pérez *et al.* 2019), situación que ocurre más lentamente en capas un poco más profundas donde básicamente ocurre

incorporación de biomasa radical. Sin embargo, en el tiempo esta fracción de COS se vuelve más importante al ir incorporando cantidades que contribuye con el incremento, tal y como se observó en la presente investigación donde a los 11 años de establecida la pastura mejorada se ha incrementado el valor de COS en el tracto de 10 a 20 cm de profundidad (figura 6). La situación es similar en la capa de suelo ubicada entre 20 y 30 cm de profundidad.

Cambio en el contenido del carbono del suelo

El cambio estimado en la cantidad de carbono en ambas profundidades (0 – 30 y 30 – 50 cm) muestra valores negativos tres años luego del establecimiento de la especie mejorada (Cuadro 5). Si bien se presenta una tendencia al incremento en el valor de carbono a partir de los tres años, 15 años después de la siembra de la brizantha todavía no se muestran valores de carbono como los originales (Cuadro 5). Sin embargo, es claro que la diferencia en la cantidad de carbono con respecto a la original (T0) se reduce con el tiempo de establecimiento, lo cual es muestra clara del aporte de carbono al suelo que es realizado por la gramínea mejorada.

La introducción y siembra de gramíneas mejoradas usualmente son precedidas por la preparación mecánica del suelo, para lo cual normalmente se utiliza el arado que realiza la remoción del suelo hasta 30 cm de profundidad. Esto ha sido relacionado con incrementos de la mineralización de la materia orgánica del suelo y en consecuencia con reducciones del carbono almacenado e incrementos de las emisiones de CO₂ (Lal 2004; Smith 2014; Willems *et al.* 2011).

Cuadro 5. Cambio promedio anual en la cantidad de carbono del suelo, kg t⁻¹ suelo, según profundidad y tiempo de establecida la *Brachiaria*. Atenas, Costa Rica.

	Profundidad, cm		
	0-30	30-50	0-50
Promedio anual	kg C t ⁻¹ suelo		
3	-1,26±1,14	-3,53±1,35	-2,17±0,70
15	-0,12±0,51	-0,65±0,24	-0,33±0,40

Con relación a la profundidad de muestreo, se nota como el cambio de la gramínea provoca pérdidas de carbono a profundidades mayores a 30 cm, las cuales no serían consideradas de no muestrear a esta profundidad. Similares (Noponen *et al.* 2013; Chatterjee *et al.* 2020) y contrastantes (Chatterjee *et al.* 2020) resultados han sido reportados para el cultivo del café.

La importancia de tener una clara visión de lo que está pasando con el carbono del suelo, no solo a nivel superficial, es relevante para desarrollar prácticas que efectivamente contribuyan al menos a mantener estable el carbono del suelo, y a contribuir con la mitigación del cambio climático.

Relación Carbono/Nitrógeno del suelo

Se determinó interacción ($P < 0,00145$) tratamiento*profundidad, donde los valores de la relación carbono:nitrógeno (C/N) en T15 mostraron ser menores en los estratos más profundos con respecto a los de T0 y T3 (figura 7). Los valores de esta relación fueron similares hasta los 30 cm de profundidad para todos los tratamientos. En general, los valores se incrementan con la profundidad, aunque T15 mostró estabilidad a partir de los 20 cm (Figura7).

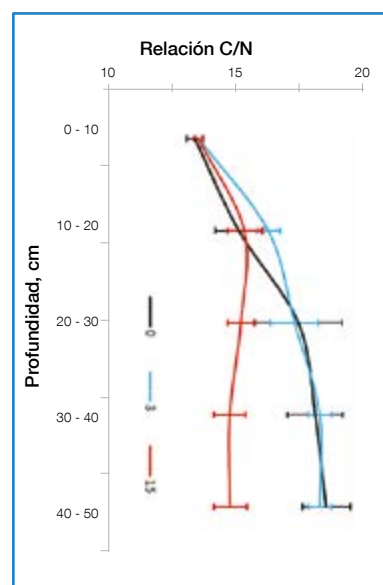


Figura 7. Relación C/N en el perfil del suelo (0 – 50 cm) bajo *Brachiaria* con diferente tiempo de establecida. Atenas, Costa Rica.

Todos los tratamientos mostraron que el contenido de N correlacionó ($P < 0,0001$) de forma lineal y positiva con el carbono del suelo (r^2 entre 0,97 a 0,99), mostrando como al incrementarse el N también se aumenta el C. Los datos agrupados mostraron la misma tendencia (figura 8).

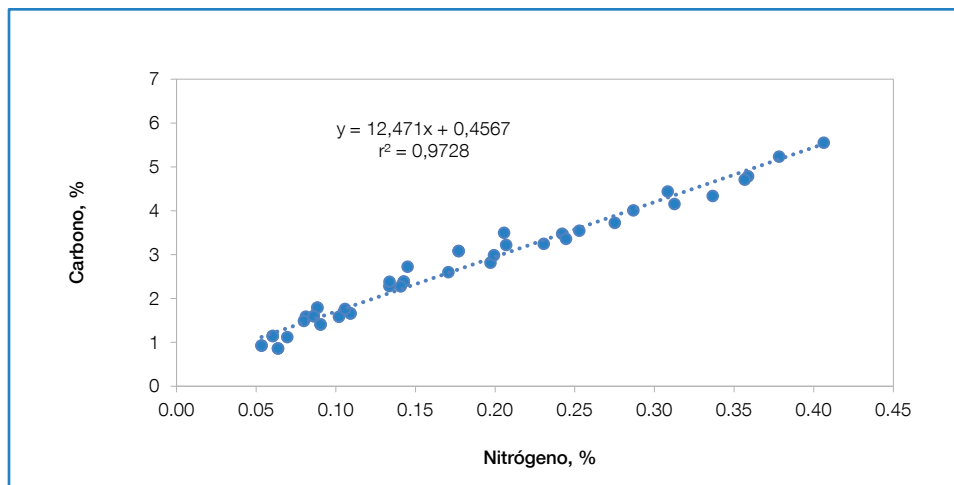


Figura 8. Relación entre carbono y nitrógeno (N) de un suelo bajo *Brachiaria*. Atenas, Costa Rica.

También se determinó correlación lineal ($P < 0,0001$) entre el contenido de arcilla y el de carbono con todos los datos agrupados, pero en este caso la relación fue negativa, es decir, se reduce el carbono cuando el contenido de arcilla aumenta (figura 9).

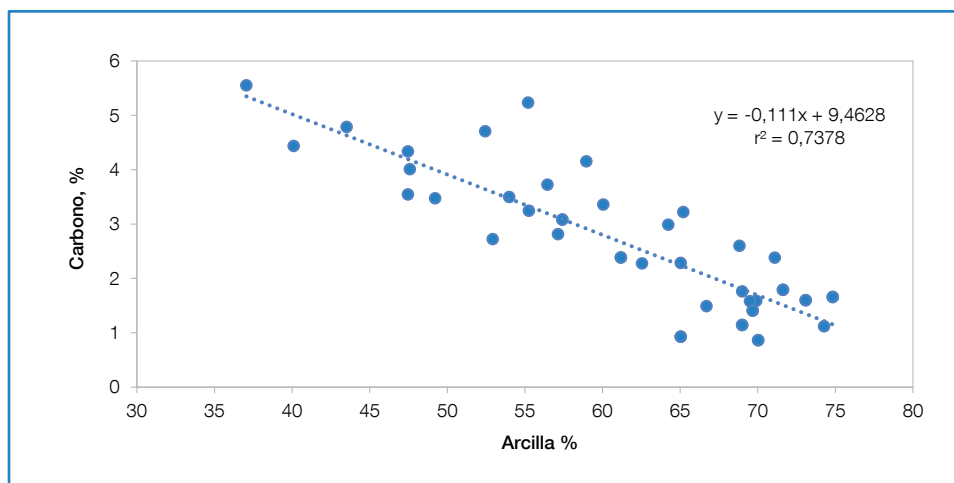


Figura 9. Relación entre el contenido de carbono y de arcilla de un suelo bajo *Brachiaria*. Atenas, Costa Rica.

Ello es contrario a lo reportado en la literatura donde normalmente se asocian mayores niveles de carbono del suelo con más arcilla (Avilés-Marín *et al.* 2007). Sin embargo, esta aparente contradicción se explica por los altos contenidos de arcilla de este suelo, que en algunos casos supera el 70% de las partículas del suelo. Bajo estas condiciones, y dada la compactación observada que impidió la introducción del barreno mecánico y señalado en la sección de materiales y métodos, se disminuye la profundidad de las raíces. La compactación es asociada con problema de penetración y desarrollo de las raíces, obteniéndose como resultado la reducción de la biomasa

radical (Kinner *et al.* 2009; Paripovich *et al.* 2010), y en consecuencia los valores de carbono obtenidos son los más bajos (Cuadro 4).

En ambas fincas, a pesar de que las condiciones climáticas y de suelo son contrastantes, el patrón de distribución del carbono en el suelo fue similar, disminuyó con la profundidad (Céspedes *et al.* 2012), sin que aparentemente la edad del establecimiento influyera en este comportamiento. De igual forma para ambas regiones, el perfil superior (0-30 cm) contiene mayor cantidad de COS por unidad de suelo que el determinado en la parte más profunda del perfil evaluado (Figuras 2 y 5).

Coincidentemente luego del establecimiento de la gramínea mejorada, es clara la tendencia de la reducción de COS en ambas fincas. Ello se nota claramente por los valores negativos (Cuadros 3 y 5), en el perfil superior (0-30 cm). Sin embargo, con el paso del tiempo de establecida la gramínea mejorada, se empiezan a recuperar los contenidos de COS en Atenas. En el caso de Guápiles, los valores del COS se incrementaron con respecto al valor inicial (T0). Ello muestra el efecto benéfico de la introducción de las especies mejoradas.

En Guápiles en la mayor profundidad del perfil (30-60 cm) la situación es diferente por cuanto el COS mostró tendencia al incremento. Las labores de preparación del suelo al no ser tan profundas, no influyen la descomposición más rápida de la materia orgánica como si lo estimularon en el perfil superior. Además, las condiciones de suelo franco favorecen el crecimiento de las raíces de las especies mejoradas que hacen que con el tiempo depositen residuos y exudados que mejoran el contenido de COS.

En el caso de Atenas, la condición de suelo arcilloso que de manera conjunta con las condiciones climáticas típicas del trópico seco, desfavorecen, la primera la penetración de las raíces y, la segunda el crecimiento vegetativo durante una parte significativa del año debido a la estacionalidad de las lluvias. Lo anterior hace que, en términos generales, el COS en el perfil evaluado se incremente en Guápiles, pero disminuya en Atenas (Cuadros 3 y 5).

Por lo anterior es que se requiere considerar el efecto del clima (Abdalla *et al.* 2018) y las características del suelo (Pringle *et al.* 2011) en la variación del contenido de carbono. El primero influye directamente el patrón de crecimiento de las gramíneas a lo largo del año, y el segundo la facilidad de penetración de las raíces en el perfil del suelo. Por ello la pastura mejorada sembrada en condiciones contrastantes repone el carbono perdido por la preparación del suelo en tiempos diferentes (Cuadros 3 y 5).

También fue clara la relación del nitrógeno con el carbono del suelo, y ello muestra otro beneficio de la implementación de prácticas que conduzcan al incremento de la disponibilidad de nitrógeno en el suelo dada su relación con el desarrollo y producción de biomasa de las gramíneas, lo cual tiene relación directa con el carbono en el suelo (van Groenigen *et al.* 2017).

La profundidad de muestreo muestra que, dependiendo de las condiciones climáticas de la región donde se ubique la actividad de interés, el carbono del suelo a profundidades mayores a los 30 cm podría contribuir a mitigar, o bien, a incrementar la concentración de este elemento en la atmósfera. Se requiere realizar este tipo de investigación en diferentes actividades agrícolas para dilucidar si este patrón climático es consistente con el contenido de carbono a profundidades como las referenciadas.

Basado en lo observado con los resultados obtenidos, se recomienda en la medida de lo posible, minimizar el laboreo del suelo previo a la siembra, ya que fue evidente la reducción del carbono durante los años posteriores a la siembra. La utilización de prácticas de establecimiento con mínima labranza podría reducir la disminución de carbono (Aguilera *et al.* 2013) y quizás se observarían mayores incrementos de este elemento en el tiempo. Sería aconsejable incluir esta variable comparativa en próximos muestreos.

De igual manera se recomienda la introducción de leguminosas asociadas a la gramínea que favorezcan la disponibilidad de nitrógeno, lo cual estimularía el crecimiento de las pasturas mejoradas y con ello probablemente se podría incrementar el carbono del suelo (van Groenigen *et al.* 2017).

Es deseable continuar los muestreos en el tiempo, en los mismos puntos utilizados en la presente investigación, para corroborar o determinar nuevas tendencias. Además, sería interesante incrementar el número de puntos de muestreo y con ello tratar de reducir la variabilidad observada para lograr determinar diferencias significativas entre las variables consideradas.

Sería importante incluir otras especies de gramíneas mejoradas para determinar si el comportamiento en términos de incremento de carbono en el suelo con el tiempo es similar al observado hasta el momento con la *B. brizantha*.

Se deberían realizar dos ciclos de muestreos espaciados al menos tres años para observar y determinar si existe variación en el contenido de carbono del suelo en el mismo sitio debido a la introducción de la gramínea mejorada con el manejo establecido, y con ello corroborar lo determinado en esta investigación.

AGRADECIMIENTOS

La presente investigación es parte de la Cuarta Comunicación Nacional y el Segundo Informe Bienal de Actualización de Costa Rica ante la CMNUCC – 00098756, y se ha efectuado bajo la tutela del Convenio entre el Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA) y el Instituto Meteorológico Nacional (IMN), con el financiamiento parcial del

Fondo Global del Ambiente (GEF por sus siglas en inglés) Costa Rica. También se agradece el apoyo financiero de FUNDECOOPERACION lo cual hizo posible el desarrollo de esta investigación.

Se agradece a personal de la Estación Experimental Los Diamantes (EELD) por el apoyo recibido durante las labores de muestreos.

LITERATURA CITADA

Abdalla, M; Hastings, A; Chadwick, D; Jones, D; Evans, C; Jones, M; Rees, R; Smith, P. 2018. Critical review of the impacts of grazing intensity on soil organic carbon storage and other soil quality indicators in extensively managed grasslands. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 253:62-81.

Acharya, B; Rasmussen, J; Eriksen, J. 2012. Grassland carbon sequestration and emissions following cultivation in a mixed crop rotation. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 153:33-39.

Aguilera, E; Lassaletta, L; Gattinger, A; Gimeno, B. 2013. Managing soil carbon for climate change mitigation and adaptation in Mediterranean cropping systems: a meta-analysis. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 168:25-36.

Andrade, H; Espinoza, E; Moreno, H. 2014. Impact of grazing on soil organic storage carbon in high lands of Anaime, Tolima, Colombia. *Zootec. Trop.* 32:7-21.

Arguedas, F; Hernández, M; Abarca, S; Soto, R. 2020. Adicionalidad de carbono orgánico de suelo en pasto cayman manejado con enfoque Voisin. *Alcances Tecnológicos*, en prensa.

Assad, E; Pinto, H; Martins, S; Groppo, J; Salgado, P; Evangelista, B; Vasconcellos, E; Sano, E; Pavão, E; Luna, R; Camargo, P; Martinelli, L. 2013. Changes in soil carbon stocks in Brazil due to land use: paired site comparisons and a regional pasture soil survey. *Biogeosciences* 10:6141-6160.

Avilés-Marín S; Galvis-Spinola, A; Hernández-Mendoza, T; Arévalo-Galarza, G. 2007. Relación de la textura y superficie específica con la materia orgánica del suelo en selvas. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 13(2):109-113.

Baldock, J. 2007. Composition and cycling of organic carbon in soil. In: Marshner, P; Rengle, Z (eds) *Nutrient cycling in terrestrial ecosystems*. Springer-Verlag, Berlin, p. 1-27.

Braz, S; Urquiaga, S; Alves, B; Jantalia, C; Guimarães, A; dos Santos, C; dos Santos, S; Machado, É; Boddey, R. 2013. Soil carbon stocks under productive and degraded brachiaria pastures in the Brazilian Cerrado. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 77:914-928.

Céspedes, F; Fernández, J; Gobbi, J; Bernardis, A. 2012. Reservorio de carbono en el suelo y raíces de un pastizal y una pradera bajo pastoreo. *Rev. Fitotec. Mex.* 35:79-86.

Chatterjee, N; Ramachandran, P; Nair, V; Bhattacharjee, A; de Melo, E; Muschler, R; Noponen, M. 2020. Do coffee agroforestry systems always improve soil carbon stocks deeper in the soil? A case study from Turrialba, Costa Rica. *Forests* 11:49-72.

Conant, R; Paustian, K; Elliot, E. 2001. Grassland management and conversion into grassland: effects on soil carbon. *Ecol. Appl.* 11:343-355.

- Costa, F; Sales, M; Valentim, J; Bardales, N; Amaral, E; Costa, C; Catani, V. 2016. Soil carbon sequestration in grass and grass-legume pastures in the western Brazilian Amazon. II SIGEE – Second International Symposium on Greenhouse Gases in Agriculture – Proceedings. p. 353-355.
- DiRienzo, J; Casanoves, F; Balzarini, M; Gonzalez, L; Tablada, M; Robledo, C. 2018. InfoStat versión 2018, Grupo InfoStat, FCA. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Eclisa, R; Jobbagy, E; Jackson, R; Biganzoli, F; Piñeiro, G. 2012. Shifts in soil organic carbon for plantation and pasture establishment in native forests and grasslands of South America, *Glob. Change Biol.* 18:3237-3251.
- Espinoza, Y. 2010. Efecto de la labranza sobre la materia orgánica y tamaño de agregados en un suelo cultivado con maíz en condiciones tropicales. *Bioagro* 22(3):177-184.
- Fisher, M; Rao, I; Lascano, E; Sanz, J; Thomas, R; Vera, R; Ayarza, M. 1995. Pasture soils as carbon sink. *Nature* 376:473
- Hernández, R; López, D. 2002. El tipo de labranza como agente modificador de la materia orgánica: un modelo para suelos de sabana de los llanos centrales venezolanos. *Interciencia* 27(10):529-553.
- Holdridge, L. 2000. *Ecología basada en zonas de vida*, Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, San José, Costa Rica. 96 p.
- Kinner, A; Lunt, I; Spooner, P; McIntyre, S. 2009. The effect of soil compaction on germination and early growth of *Eucalyptus albens* and an exotic annual grass. *Austral Ecology* 34(6):698-704.
- Lal, R. 2004a. Soil carbon sequestration impacts on global climate change and food security. *Science* 304: 1623–1627.
- Liebig, M; Gross, J; Kronberg, S; Phillips, R; Hanson, J. 2010. Grazing management contributions to net global warming potential: a long-term evaluation in the Northern Great Plains. *J. Environ. Qual.* 39:799-809.
- Livestock Environmental Assessment and Performance. 2018. Guidelines for measuring soil carbon stocks and stock changes in livestock productions systems (Draft). FAO, Rome. 144p.
- Maia, S; Ogle, S; Cerri, C; Cerri, C. 2009. Effect of grassland management on soil carbon sequestration in Rondônia and Mato Grosso states, Brazil. *Geoderma* 149(1-2):84-91.
- McSherry, M; Ritchie, M. 2013. Effects of grazing on grassland soil carbon: a global review. *Glob. Chang. Biol.* 19:1347-1357.
- Nojonen, M; Healey, J; Soto, G; Haggard, J. 2013. Sink or source—The potential of coffee agroforestry systems to sequester atmospheric CO₂ into soil organic carbon. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 175:60-68.
- Paripovich, D; Balks, M; Schipper, L; Lowe, D. 2010. Impacts of conversion from forestry to pasture on soil physical properties of Vitrandis (Pumice Soils) in central North Island, New Zealand. *In World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World*, (19, 2010, Brisbane, Australia). Memoria. Brisbane, Australia. Published on DVD.
- Paz, F; Etchevers, J. 2016. Distribución a profundidad del carbono orgánico en los suelos de México. *Terra Latinoamericana* 34: 339-355.
- Pérez, M; Medina, M; Hurtado, A; Arboleda, E; Medina, M. 2019. Reservas de carbono del pasto *Cenchrus clandestinus* (Poaceae) en los sistemas de manejo tradicional y silvopastoril, en diferentes relieves. *Revista de Biología Tropical* 67(4):769-783.
- Pringle, M; Allen, D; Dalal, R; Payne, J; Mayer, D; O'Reagain, P; Marchan, B. 2011. Soil carbon stock in the tropical rangelands of Australia: Effects of soil type and grazing pressure, and determination of sampling requirement. *Geoderma* 167-168:261-273.
- Rumpel, C; Kögel-Knabner, I. 2011. Deep soil organic matter – a key but poorly understood component of terrestrial C cycle. *Plant Soil* 338: 143-158.
- Smith, P. 2014. Do grasslands act as a perpetual sink for carbon? *Global Change Biol.* 20:2708-2711.

Smith, P; Martino, D; Cai, Z; Gwary, D; Janzen, H; Kumar, P; McCarl, B; Ogle, S; O'Mara, F; Rice, C; Scholes, B; Sirotenko, O; Howden, M; McAllister, T; Pan, G; Romanenkov, V; Schneider, U; Towprayoon, S; Wattenbach, M; Smith, J. 2008. Greenhouse gas mitigation in agriculture. *Philos. Trans. R. Soc. B.* 363:789–813.

Sotomayor-Ramírez, D; Espinoza, Y; Ramos-Santana, R. 2007. Short-term tillage practices on soil organic matter pools in a tropical Ultisol. *Australian J. Soil Research* 44:687-693.

van Groenigen, J; van Kessel, C; Hungate, B; Oenema, O; Powlson, D; van Groenigen, K. 2017. Sequestering soil organic carbon: a nitrogen dilemma. *Environ. Sci. Technol.* 51(9):4738-4739.

Villalobos, E. 2010. Respuesta del pasto ratana (*Ischaemum indicum*) a la fertilización nitrogenada y edad de rebrote. Tesis Ing. Agr. Cartago, Costa Rica. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 57 p.

Willems, A; Augustenborg, C; Hepp, S; Lanigan, G; Hochstrasser, T; Kammann, C; Muller, C. 2011. Carbon dioxide emissions from spring ploughing of grassland in Ireland. *Agric. Ecosyst. Environ.* 1414:347-351.