

PROYECTO BIOTRANSFER

**Transferencia de la investigación biotecnológica
orientada a la rentabilidad empresarial y
movilización de flujos de negocio**

**Informe final de la ULL de la actividad 2 (Elaboración de
protocolos para la realización de pruebas de concepto)**

MARZO 2016



INDICE

1	PROYECTO BIOTRANSFER.....	1
2	ACTIVIDAD 2: ELABORACIÓN DE PROTOCOLOS PARA PRUEBAS DE CONCEPTO.....	1
3	PROTOCOLOS PARA LA REALIZACIÓN DE PRUEBAS DE CONCEPO: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA.....	3
3.1	ELABORACIÓN DE UN <i>ARRAY</i> PARA LA IDENTIFICACIÓN VARIETAL DE <i>VITIS VINIFERA</i> MEDIANTE SNPS	3
3.1.1	Antecedentes:	3
3.1.2	Objetivos:	4
3.1.3	Plan de trabajo y metodología.....	5
3.1.4	Bibliografía.....	6
4	PROTOCOLOS PARA LA REALIZACIÓN DE PRUEBAS DE CONCEPTO: UNIVERSIDAD DE MADEIRA	7
4.1	CULTIVO DE VARIEDADES DE FRIJOL A PARTIR DE SEMILLAS CERTIFICADAS	7
4.1.1	Antecedentes	7
4.1.2	Objetivos	8
4.1.3	Plan de trabajo.....	9
4.1.4	Metodología.....	9
4.1.5	Bibliografía.....	13



1 PROYECTO BIOTRANSFER

BIOTRANSFER es un proyecto para la transferencia de la investigación biotecnológica orientada a la rentabilidad empresarial y movilización de flujos de negocio cofinanciado por el Programa de Cooperación Transnacional Madeira, Azores y Canarias (2007-2013). En este proyecto participa el Cabildo Insular de Tenerife, como Jefe de Filas, así como la Universidad de La Laguna, Universidade da Madeira, Universidade dos Açores, Fundação Gaspar Frutuoso y Universidade de Cabo Verde. El objetivo prioritario de BIOTRANSFER es implantar un modelo de investigación biotecnológica rentable en el cual la actividad de I+D de los socios participantes esté alineada con las necesidades de las empresas del sector biotecnológico en la Macarronesia, para conectar de forma eficiente la investigación con el mercado, convirtiéndola así en una oportunidad laboral y de negocio.

2 ACTIVIDAD 2: ELABORACIÓN DE PROTOCOLOS PARA PRUEBAS DE CONCEPTO

Uno de los ejes principales de actuación del proyecto BIOTRANSFER es la identificación de resultados de investigación susceptibles de convertirse en un producto comercial innovador y económicamente rentable. La escasa transferencia de conocimiento entre Universidades y empresas impide en muchas ocasiones que buenos resultados derivados de la investigación biotecnológica den lugar a productos comerciales rentables. Si bien es cierto que nada puede asegurar el éxito o fracaso de un nuevo producto, debido a los numerosos factores ajenos a nuestro control, el nivel de incertidumbre puede reducirse notablemente mediante la realización de pruebas de concepto. Estas pruebas son una poderosa herramienta para determinar si un producto tiene o no viabilidad en el mercado, ya que valoran la aceptación del producto antes de comenzar su desarrollo a nivel comercial, evitándose así comprometer numerosos recursos. Al mismo tiempo la realización de pruebas de concepto también permite obtener información valiosa sobre cómo mejorar aquellos productos que sí tienen viabilidad comercial pero necesitan redefinir o cambiar algunos aspectos para implementar el éxito comercial.

La Universidad de la Laguna ha trabajado durante la ejecución de la actividad 2 del proyecto BIOTRANSFER estudiando las investigaciones realizadas por los diferentes grupos de investigación de las Universidades Macarronésicas, seleccionando algunos resultados derivados



de ellas que podrían dar lugar en el futuro a un producto comercial rentable económicamente. En total se identificaron 6 resultados, de los cuales 3 se han llevado a cabo por grupos de la Universidad de la Laguna y los 3 restantes por grupos de la Universidad de Madeira. Como segunda parte de la actividad 2 se ha trabajado también en el diseño y elaboración de protocolos específicos para llevar a cabo las pruebas de concepto correspondientes a cada uno de los resultados seleccionados.

En aras de preservar la confidencialidad de las investigaciones y de las posibles patentes que pudieran derivar de ellas, solamente se dispone de autorización para la publicación de resultados de dos de los seis resultados seleccionados, detallados a continuación en el informe. Como prueba del éxito del proyecto BIOTRANSFER podemos comentar que uno de los resultados de investigación identificados, pero del cual no se obtuvo autorización para publicar resultados, ha sido de interés para una empresa privada y actualmente se está llevando a cabo su desarrollo para lanzar al mercado un producto basado en él.





3 PROTOCOLOS PARA LA REALIZACIÓN DE PRUEBAS DE CONCEPO: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

3.1 ELABORACIÓN DE UN ARRAY PARA LA IDENTIFICACIÓN VARIETAL DE *VITIS VINIFERA* MEDIANTE SNPS

3.1.1 ANTECEDENTES:

El cultivo de la vid fue introducido en las Islas Canarias en el siglo XV, tras su colonización, y durante los siglos XVI y XVII, alcanzó una gran importancia, principalmente debido a la situación privilegiada del Archipiélago Canario, así como por la calidad de los vinos obtenidos. Con el paso de los años, Canarias ha mantenido un rico patrimonio de variedades de vid, gracias, en gran parte, a su carácter insular, lo que le ha mantenido alejado en gran parte de plagas como la de la filoxera que destruyó, en el siglo XIX, varios millones de hectáreas de viñedos en Europa, motivando la desaparición de muchas variedades de vid cultivadas hasta entonces en Europa.

Actualmente el cultivo de la vid en el Archipiélago se sitúa en el segundo lugar en importancia, en cuanto a superficie cultivada, después del plátano, ocupando 8786 ha, lo que supone el 21,15% de la superficie total de cultivos. En los últimos años se ha producido un abandono gradual de variedades locales minoritarias, llegando incluso a la amenaza de extinción, con lo que el patrimonio genético en la actualidad corre peligro de perderse. De hecho, actualmente en las Islas Canarias, el 93,74% de la superficie cultivada de vid está ocupada por tan sólo seis variedades, que son en orden de importancia las siguientes: Listán Blanco, Listán Negro, Malvasía, Negramoll, Forastera Blanca y Vijariego Blanco (Gutiérrez-Reyes, J. y Rodríguez-Torres, I., 2010).

El grupo de investigación en genética dirigido por el Dr. Mariano Hernández Ferrer del Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias, de la Universidad de la Laguna lleva más de 10 años utilizando técnicas de biología molecular para identificar tanto variedades canarias como de otras procedencias (Cabo Verde, proyecto ENOMAC) basándose en la identificación de 10 microsatélites (los 6 microsatélites exigidos por la OIVV y 4



microsatélites mas). Sin embargo, el genotipado por microsatélites tiene algunos inconvenientes y en los últimos años, nuevos marcadores polimórficos de único nucleótido (SNPs, del inglés *Single Nucleotide Polymorphism*), vienen imponiéndose como una nueva herramienta altamente eficaz para la identificación de variedades de vid. El grupo del Dr. Hernández quiere diseñar un chip de genotipado, que integraría 48 SNPs, que permitiría analizar/identificar más de 50 variedades para 48 de estos SNPs de manera simultánea, lo que permitiría identificar inequívocamente cualquiera de las variedades.

La identificación del mosaico varietal tradicional tendrá una incidencia directa sobre los sistemas de producción de vinos al potenciar la utilización de variedades locales, lo que permitirá obtener una producción de mayor calidad que garantizará la elaboración de caldos diferenciados con una seña de identidad propia de las islas, cuestión que siempre significa un valor añadido y suele suponer un aumento en las ventas derivado de un cierto componente “sentimental”. Conocer la variedad exacta también posibilitaría planificar y distribuir los viñedos de acuerdo a las condiciones particulares que cada variedad requiere.

La potenciación del cultivo de variedades locales junto con criterios de alta productividad, será la base sobre la que se fundamentará la mejora de la competitividad de las producciones de vinos en Canarias y en otras islas de la Macarronesia. Además, la identificación de variedades permitirá crear una importante base de datos fácilmente homologable con otras bases de datos por la caracterización además de variedades ampliamente distribuidas en todo el mundo.

Como paso previo a ofertar esta técnica a los viticultores y profesionales de la enología es necesario realizar una prueba de concepto que permita evaluar el grado de interés del sector por este servicio y sus posibilidades desde un punto de vista económico.

3.1.2 OBJETIVOS:

De cara a la posible aplicación en el sector vitivinícola de un chip de genotipado que permita la identificación varietal de las vides se propone el siguiente objetivo:

- Evaluar la aceptación por parte de los viticultores y profesionales del sector vitivinícola del chip de genotipado, mediante una presentación de resultados y la posterior evaluación de su interés mediante un test de concepto.

3.1.3 PLAN DE TRABAJO Y METODOLOGÍA.

1. Diseño de arrays de genotipado.

La selección de los 48 SNPs se hará de acuerdo con la literatura actual existente (Ibañez *et al* 2006). Una vez seleccionados, se diseñará un *array* que incluya las sondas y *primers* que permitan identificar cada uno de los SNPs en las muestras que se analicen. La elaboración de *array* la realizara la compañía. De entre todos los posibles SNPs se seleccionaran aquellos ensayos estén disponibles dentro del catálogo de *Applied Biosystem*, o que puedan ser encargados para su elaboración.

2. Genotipado de diferentes muestras de vid.

Se recibirán muestras de en torno 450 plantas procedentes de unas 65 fincas, que comprenderán todas las denominaciones de origen de Tenerife. Las extracciones de DNA se realizaran siguiendo el protocolo descrito por Borrego *et al* 2000. El genotipado se realizará en el Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias (IUETSPC) en dónde se dispone de un equipo de PCR cuantitativa de alto rendimiento (*QuantStudio 12 k flex Real-time PCR*) diseñado entre otros para este tipo de análisis. Esto permitiría analizar más de 50 variedades para 48 de estos SNPs de manera simultánea. El protocolo de genotipado se realizará de acuerdo a las recomendaciones de *Applied Biosystem*.

3. Test de concepto

Los resultados serán presentados al segmento objetivo (profesionales del sector vitivinícola, bodegueros, personal del Cabildo, etc), con el objetivo de evaluar su interés por el servicio y estimar la viabilidad económica. Para ello se les realizará un test de concepto consistente en preguntas, como:

- ¿Considera usted que este producto resuelve un problema o satisface una necesidad?
- ¿Es razonable el precio en relación con la información obtenida?
- ¿En la actualidad, otros productos cubren esta necesidad?
- ¿Usaría usted este servicio?



4 PROTOCOLOS PARA LA REALIZACIÓN DE PRUEBAS DE CONCEPTO: UNIVERSIDAD DE MADEIRA

4.1 CULTIVO DE VARIEDADES DE FRIJOL A PARTIR DE SEMILLAS CERTIFICADAS

4.1.1 ANTECEDENTES

El frijol es uno de los alimentos más antiguos conocido del hombre y ha formado parte importante de la dieta humana desde tiempos remotos. El frijol común empezó a cultivarse hace aproximadamente 7000 años A.C. en Perú, el sur de México y Guatemala. Los archivos históricos, corroborados por los análisis de origen fitogeográfico, indican que el frijol común fue introducido en Madeira en el siglo dieciséis probablemente desde Brasil y Centroamérica. El frijol es una fuente principal de proteínas, fibra y minerales ocupando un lugar destacado en la alimentación mundial. También cabe destacar la elevada cantidad de folatos que aporta y el contenido equilibrado en demás vitaminas del grupo B exceptuando la B₁₂.

El frijol común es el cultivo de leguminosas que mayor producción genera en Madera y juega un papel fundamental en la economía de la zona, con una producción media de 2811 toneladas en aproximadamente 170 hectáreas. El frijol común es conocido por su morfología variable y su gran adaptación a los diferentes ambientes creando un gran mosaico de variedades locales. Al mismo tiempo su composición nutricional se ve condicionada por factores tales como la genética, su origen, las condiciones ambientales y las de crecimiento. En la actualidad, la pérdida de diversidad en los cultivos y la extinción de algunas fuentes genéticas están llevando a la disminución de la calidad nutricional con la mayoría de la diversidad genética de los cultivos de frijol. Los productores en su mayoría pequeños, producen sus semillas de forma artesanal pero con métodos tradicionales de siembra y cosecha y con la ausencia de trazabilidad del producto, todo esto, además de las limitaciones económicas dificulta que un pequeño productor tenga un buen acceso a semillas de alta calidad.

La calidad de las semillas es crítica para la producción agropecuaria; una semilla pobre limita el potencial de rendimiento y reduce la productividad de la mano de obra del agricultor. Cuando la semilla tiene buenas cualidades físicas, fisiológicas, sanitarias y genéticas, los agricultores tienen mayores perspectivas de producir un cultivo saludable con rendimientos



mejorados. Una semilla de alta calidad es un factor muy importante para la obtención de un cultivo con buena población y un rápido desarrollo de plantas aún bajo condiciones adversas, aunque otros factores como la lluvia, las prácticas agronómicas, la fertilidad del suelo y el control de plagas también son cruciales. De esta forma, algunos trabajos de investigación confirman que con el solo hecho de emplear una semilla de buena calidad se incrementan en un 30% los rendimientos. Una solución a la ausencia de semillas de calidad sería la producción in situ de semillas certificadas de variedades locales.

El grupo del Dr. Pinheiro de Carvalho de la Universidad de Madeira, en colaboración con Isoplexis lleva años analizando la calidad nutricional de semillas locales de frijol en Madeira, identificando especies o variedades de las mismas, evaluando su capacidad de germinación, su grado de pureza e identificando si existe presencia de hongos en las semillas. De esta manera podrán seleccionarse semillas para generar semillas certificadas para el cultivo que permitirán mejorar tanto el rendimiento como la calidad de la producción de frijoles en Madeira. Esto permitirá obtener una buena producción de semilla de frijol de forma artesanal, donde el productor tenga de forma accesible las condiciones necesarias para poder producir una semilla de bajos costos. Esto se hará con la implementación de Buenas Prácticas Agrícolas, que garanticen una producción inocua y que los productores tendrán la posibilidad de obtener cosecha certificada.

Como paso previo a su producción a gran escala es necesario realizar una prueba de concepto mediante la producción a pequeña escala de semillas certificadas de alguna variedad de frijol para que sean sembradas y utilizadas por algunos agricultores. Una vez recogida la cosecha se daría el producto a probar a los consumidores para evaluar su aceptación. Esta prueba de concepto permitirá comprobar la mejora en la producción y el grado de satisfacción de los productores frente a las semillas sin certificar, así como la aceptación por parte de los consumidores. Si estos estudios confirman que las semillas certificadas son mejores desde el punto de vista varietal, productivo, nutritivo y sensorial que las semillas tradicionales será factible su extensión a otras variedades de frijol y de otro tipo de cultivos en Madeira a mayor escala.

4.1.2 OBJETIVOS





Esta prueba de concepto consiste en desarrollar variedades de cultivo del frijol mediante semillas certificada. La aplicación de este protocolo, unido a una capacitación en muestreo de lotes e identificación de enfermedades, brindará a las asociaciones de productores independencia en la producción y accesibilidad a la semilla.

4.1.3 PLAN DE TRABAJO

1. Selección de los terrenos.
2. Siembra, manejo de malezas, plagas y enfermedades.
3. Inspección de campo y análisis de riqueza varietal. Normas ISTA.
4. Cosecha.
5. Muestreo de semillas.
6. Análisis de calidad de las semillas cosechadas.
7. Almacenamiento y etiquetado.
8. Reparto de semillas certificadas entre un número reducido de agricultores.
9. Test de concepto para analizar el grado de satisfacción de los agricultores.

4.1.4 METODOLOGÍA

1. Selección del terreno.

El Comité de Semillas, seleccionará y efectuará la inspección previa de las fincas antes de considerarlas aptas para la producción de semilla. Las tierras de cultivo deberán cumplir los siguientes requisitos:

- Durante al menos un año, no se debe haber cultivado frijol en el terreno seleccionado.
- El terreno deberá rotarse con una gramínea: maíz, sorgo o arroz. Con esta estrategia se evita la contaminación con otras variedades y se reduce la presencia de patógenos en el suelo o en los rastrojos.
- La ubicación del terreno debe ser de fácil acceso, con el propósito de facilitar las fiscalizaciones, su orografía deberá permitir realizar las labores de arado y deben estar separadas 200 metros de otro campo de cultivo.



- Que cuente con buen drenaje para evitar encharcamientos y vías de acceso en todo tiempo.
- No se haya reportado enfermedades durante el ciclo anterior.
- No se haya sembrado con otra variedad de frijol diferente a la que se va a establecer.

2. Siembra, manejo de malezas, plagas y enfermedades.

La siembra se realizará con una mayor distancia entre surcos o hileras de siembra, que la usada a nivel comercial. Las semillas utilizadas en la siembra serán semillas fundación. El combate de malezas se realizará de 30 a 15 días antes de la siembra, después de la siembra se aplicará herbicidas pre-emergentes, lo que facilitará posteriormente el combate de malezas entre surcos, con el uso de cobertores de boquilla (Hernández y Araya 2003).

En el momento de la siembra, se iniciará el control preventivo de plagas y enfermedades con la aplicación de fungicidas e insecticidas sistémicos. Para ello se eliminarán todas las plantas que presenten patógenos transmisibles en la semilla. Los focos de antracnosis, bacteriosis, mustia hilachosa, serán erradicados sacando las plántulas fuera del cultivo y adicionando al cultivo agroquímicos específicos para su prevención y combate. En la etapa de floración se eliminarán tanto las plantas con flores de otro color como las vainas rayadas o de otro color.

3. Inspección de campo y análisis de riqueza varietal

En la fase de crecimiento del cultivo se llevara a cabo una inspección de campo para determinar que el cultivo es consistente en conjunto con las características de la variedad incluidas en la descripción oficial. Esto se hará adentrándose en el cultivo de semillas y examinando un número razonable de plantas. Las zonas de muestreo se ubicarán de forma que todo el terreno quede cubierto, siguiendo un procedimiento predefinido de tal forma que la muestra sea representativa de todo el cultivo. También se llevará a cabo en esta fase un análisis de la pureza varietal, para determinar el número de plantas fuera de tipo presentes en el cultivo, que se expresará como un porcentaje o número máximo.



Si el porcentaje de pureza varietal no se ajusta a los cánones establecidos el campo no será considerado como adecuado para la producción de semillas certificadas.

4. Fase de cosecha.

La cosecha se llevará a cabo cuando el cultivo se encuentre en la madurez fisiológica, es decir cuando el 90% de las vainas hayan cambiado de color. En el momento cosechar las plantas hay que considerar dos aspectos: Que las plantas en el campo obtienen un secado natural del grano, perdiendo humedad poco a poco de manera uniforme. No se debe permitir que las vainas se sequen demasiado para reducir pérdidas por apertura de vainas. El pre secamiento es el secado del frijol en el campo cuyo grano tiene entre un 30% y un 50% de humedad. Para ello, se unen entre 4 y 5 plantas y se dejan en el campo para que se sequen. Si el tiempo es soleado las vainas se secarán en 3 o 4 días y se ponen quebradizas listas para el aporreo.

5. Muestreo de semillas

Para determinar la calidad de las semillas certificadas antes de su almacenamiento y distribución, se tomarán muestras de diferentes lotes de semillas cosechadas, de tal manera de que sean representativas de la cantidad total de semillas adquiridas. Estos lotes de semillas deberán ser uniformes y al haber sido cosechados de un campo específico de producción de semillas el resultado de futuros análisis pueda ser relacionado a ese campo de producción de semillas en particular. El muestreo de semillas se llevará a cabo de acuerdo con las normas internacionales publicadas por la Asociación Internacional de Análisis de Semillas (ISTA).

6. Análisis de calidad de las semillas cosechadas.

Se analizarán 4 parámetros para determinar la calidad de las semillas cosechadas:

- Calidad física de la semilla en el lote: se analizará la forma, la calidad, el color y que la semilla no presente daños por plagas y enfermedades.
- Calidad fisiológica: se analizará la capacidad de germinación del lote de semillas mediante una prueba de germinación. Para ello se tomará un recipiente con



perforaciones y se llenará con arena, se contarán 100 semillas y se distribuirán en el recipiente uniformemente a una profundidad no mayor de dos centímetros y medio, procediendo a cubrirlas con arena y evitando compactar la arena con las semillas, las cuales se regarán a diario y al quinto día se debe iniciar el proceso de germinación. El porcentaje de germinación al quinto día debe ser al menos del 80%. Es preciso para el desarrollo de la prueba de concepto contar con una cámara aclimatada para realizar las pruebas de germinación que permita analizar la calidad.

- Calidad genética, la cual se relaciona a las características genéticas específicas de la variedad de semilla.
- Sanidad de las semillas: se determinará si existe presencia o ausencia de diversas plagas en el lote de semillas.

7. Almacenamiento y etiquetado

Una vez comprobado que los diferentes lotes de semillas cumplen con todos los requisitos de calidad y una vez secas (13% de humedad) se procederá a su almacenamiento para su posterior comercialización.. Los sacos de semillas se colocaran sobre polines de madera, y se separarán de la pared para evitar exceso de calor y que las semillas puedan endurecerse. Se utilizaran tabletas de fosfamina para evitar que las semillas puedan absorber humedad ambiental. Para identificar el lote o el lugar de donde fueron tomadas las semillas se etiquetara cada bolsa o envase de manera precisa.

8. Reparto de semillas certificadas entre un número reducido de agricultores.

Se repartirá la semilla certificada obtenida entre un pequeño número de agricultores locales, para que sea sembrada y cultivada de manera natural. Al mismo tiempo se les realizará una encuesta a los agricultores donde se les preguntara acerca de la producción que obtienen normalmente, las pérdidas que sufren, la presencia de plagas etc.

9. Test de concepto para analizar el grado de satisfacción de los agricultores.



Una vez cosechado el frijol procedente de semilla certificada, se reevaluará a los agricultores, preguntándoles, además de las cuestiones realizadas en la primera encuesta, su grado de satisfacción con la nueva semilla, si han percibido un aumento en la producción, si han disminuido las pérdidas por cultivos inespecíficos, su disposición a seguir comprando semilla certificada tanto de esa variedad como de otras, el precio que estaría dispuesto a pagar por la semilla certificada etc.

10. Cata pública de frijol.

Con el objetivo de valorar si los frijoles obtenidos a partir de semilla certificada poseen las mismas características que aquellos obtenidos de semillas tradicionales se efectuará una cata pública donde se cocinarán y prepararán diferentes recetas tradicionales con frijol. Esta cata estará abierta al público y al finalizar se entregará a cada participante un cuestionario donde se le pedirá que valore aspectos como el color, el tamaño, la textura, el sabor etc. De esta manera se podrá evaluar el grado de aceptación que los frijoles producidos a partir de semilla certificada tienen entre los consumidores del producto.

11. Análisis de resultados del test de concepto y la cata pública.

Los resultados obtenidos de las dos encuestas, además de los obtenidos en la cata, serán analizados y comparados estadísticamente para ver si existen diferencias estadísticamente significativas entre la valoración de la cosecha obtenida a partir de semillas tradicionales y la obtenida a partir de semillas certificadas. Para ello se utilizará el paquete estadístico SPSS 2.0

4.1.5 BIBLIOGRAFÍA.

Cultivo de frijol, Tecnologías de pre secado en campo, /IICA/COSUDE, Proyecto RED SICTA, Red de Innovación Agrícola, Managua, Nicaragua, Junio 2009.

Duarte, N., 2008, Evaluación de diferentes niveles de Fósforo en frijol en suelos de la zona de Boaco; Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria INTA, Informe Técnico Final, 8p.

Experiencias de técnicos de INTA y ASOPROL, Santa Lucía, Boaco, Nicaragua, 2009.



Experiencias de productores de ASOPROL, Santa Lucía, Boaco, Nicaragua 2009.

Guía de identificación y manejo integrado de las enfermedades del frijol en América Central / IICA/COSUDE, Proyecto RED SICTA, Red de innovación agrícola, Managua, Nicaragua 2008 32p.

Guía tecnológica 3, Cultivo del frijol, Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria INTA, Managua, Nicaragua 15p.

MAGFOR (Ministerio de Desarrollo Agropecuario y Forestal), 1996, Normas específicas de certificación para la producción de semillas de Granos Básicos, oleaginosas, papa y café, Dirección de Semillas, Managua Nicaragua.

Mapeo de las Cadenas agroalimentaria Maíz blanco y frijol en Centro América, Proyecto Red de Innovación Agrícola/IICA/COSUDE, Managua, Nicaragua, Julio 2009.

SALINAS I. 1999, Necesidades Hídricas de los cultivos, Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria INTA, Managua, Nicaragua.

