

Distribución del raquitismo de los retoños (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*) en caña de azúcar en Cuba

Distribution of sugarcane ratoon stunting disease (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*) in Cuba

Javier Delgado-Padrón, Juana de las Mercedes Pérez-Pérez, Osmany de la Caridad Aday-Díaz, Mario Casas-González, Tania Casero-Rodríguez, Lázaro Pardo-Mora[✉], María La O-Hechavarría

Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA). Carretera CUJAE Km 1 ½. Boyeros, C.P. 19390. La Habana, Cuba.

RESUMEN: El objetivo del trabajo fue determinar la presencia de la bacteria en cultivares comerciales de diversas provincias y genotipos de la Colección de Germoplasma de la caña de azúcar en Cuba. Las muestras se colectaron en plantaciones comerciales de 13 ingenios azucareros y en la Colección de Germoplasma de la Estación Experimental de Investigaciones de la Caña de Azúcar de Matanzas. Se procesaron mediante Inmuno Impresión Directa de Tejidos y se calculó el porcentaje de plantas infectadas. En los cultivares comerciales, *L. xyli* estuvo presente en 74,3 % y, en la Colección de Germoplasma, en el 29 % de los genotipos analizados. Los cultivares con mayor incidencia de la bacteria, en las plantaciones comerciales muestreadas, fueron SP70-1284, CP52-43, C87-51, C90-469, C86-56, C88-380 y C86-12; mientras que en C132-81, C85-102, C87-252 y C86-531 no se detectó la presencia de la misma. Estos resultados evidencian la necesidad de ampliar los muestreos hacia otros ingenios azucareros y cultivares, a modo de establecer medidas de manejo de la enfermedad para disminuir los porcentajes de presencia y distribución, además de evitar la pérdida de tolerancia y resistencia de los genotipos de mejor comportamiento de la Colección de Germoplasma, lo cual garantiza la variabilidad genética de los cultivares obtenidos a través del programa de mejoramiento de plantas.

Palabras clave: Bacteria, Inmuno Impresión Directa de Tejidos, enfermedad del raquitismo de los retoños.

ABSTRACT: The objective of this work was to determine the presence of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in commercial cultivars and genotypes of the sugarcane germ plasm collection in Cuba. The sugarcane samples collected in commercial plantations of 13 sugar mills and at the Germ plasm collection of the Experimental Station of Sugarcane Research of Matanzas, Cuba. They were tested for the presence of the bacterium by tissue-blot enzyme immunoassay, and the percentage of infected plants was calculated. *L. xyli* was present in 74.3 % of the commercial cultivar and in 29% of the analyzed genotypes of the Germ plasm collection. The cultivars with the highest incidence of the bacterium in the commercial plantations sampled were SP70-1284, CP52-43, C87-51, C90-469, C86-56, C88-380, and C86-12, while it was not present in C132-81, C85-102, C87-252, and C86-531. These results showed the need to extend samplings to other sugar mills and cultivars as a way to establish measures for the disease management to reduce its percentages of presence and distribution, besides avoiding the loss of tolerance or resistance of the genotypes of the Germ plasm collection with the best performance, which guarantees the genetic variability of the cultivars obtained by the improvement program of plants.

Key words: Bacterium, Tissue-Blot Enzyme Immunoassay, Sugarcane Ratoon Stunting Disease.

[✉] Autor para correspondencia: Lázaro Pardo-Mora. E-mail: lazaro.pardo@inicamy.azcuba.cu

Recibido: 7/3/2017

Aceptado: 26/1/2018

INTRODUCCIÓN

La agroindustria azucarera en Cuba experimentó un descenso a partir de la década de los 90, debido a diferentes factores, entre los que se encuentran los fitosanitarios (1). Para revertir esta situación se requiere aumentar la producción de caña de azúcar mediante el incremento del rendimiento agrícola, el manejo adecuado de los cultivares, el aumento de las atenciones a las plantaciones e incremento de estas, así como de un conocimiento más profundo de los principales agentes nocivos que afectan el cultivo, con la finalidad de dirigir, adecuadamente, el Programa Nacional de Obtención de Cultivares y la estructura de estos en el país.

Entre las enfermedades de mayor importancia en el cultivo de la caña de azúcar en Cuba se encuentran el carbón (*Sporisorium scitamineum* (Piepenbr) Sydow), la roya parda (*Puccinia melanocephala* Sydow y P. Sydow), la escaldadura foliar (*Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson), el virus de la hoja amarilla (SCYLV (Lockhart) Dárcy) y el raquitismo de los retoños (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Davis) Evtushenko) (2).

El agente causal del raquitismo de los retoños es una bacteria que se disemina en la planta a través del xilema e interfiere el transporte de agua y nutrientes. El patógeno se encuentra en el fluido fibrovascular del xilema y produce retraso del crecimiento, disminución del número de tallos por cepa y plantas con apariencia raquíca (3). En la base de los entrenudos se observan áreas necróticas similares a puntos, comas o líneas de coloración desde amarillo, naranja, rosa y rojo hasta marrón rojizo (4). Las pérdidas se encuentran entre 10 y 60 % de la producción, en dependencia de la tolerancia del cultivar ante la enfermedad, la cantidad de retoños cosechados sin reponer la cepa, las atenciones agronómicas efectuadas al cultivo, los estados de estrés, así como la utilización de material de propagación infectado y los instrumentos de

corte que facilitan su diseminación en las plantaciones cañeras (5,6).

En Cuba, la detección masiva de *L. xyli* no ha sido sistemática, por lo cual no existe un estudio actualizado de la distribución de este patógeno en la caña. Por ello, el presente trabajo tiene como objetivo determinar la distribución de *L. xyli*, mediante la técnica de Inmuno Impresión Directa de Tejidos, en cultivares comerciales de caña de azúcar y genotipos existentes en la Colección de Germoplasma de Matanzas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Distribución de *L. xyli* en cultivares comerciales y la Colección de Germoplasma

Para determinar la distribución de *L. xyli* en cultivares comerciales de Cuba se realizó un muestreo al azar durante los meses enero y febrero de 2011. Se colectaron 350 muestras en 13 ingenios azucareros, que comprenden 35 campos cañeros con diferentes rendimientos agrícolas y número de cosechas (de dos a tres campos por ingenio azucarero), con edades de 10 meses o más, en un área total de 348 ha. (Tabla 1)

Se definieron cinco sitios de muestreo por campo, cuatro puntos situados en las esquinas del mismo y uno central (2). En cada uno de estos se tomaron dos tallos de caña de azúcar al azar en diferentes plantones, para un total de diez tallos por campo.

En la Colección de Germoplasma del Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA), ubicada en la Estación Provincial de Investigaciones de la Caña de Azúcar (EPICA) de Matanzas, se colectaron muestras de 637 genotipos (dos tallos por genotipos), lo que significó 1274 muestras a analizar.

En todos los casos las muestras se colectaron de los entrenudos del tercio basal de las plantas de más de 10 meses de edad. El procesamiento de las muestras se realizó en el laboratorio del Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA) por la técnica

TABLA 1. Zonas y cultivares muestreados en diferentes empresas azucareras en Cuba para la detección de *L. xyli*. / Location and cultivars sampled in different sugarcane factories in Cuba for detection of *L. xyli*.

Empresas Azucareras / Provincia	Nombres de los ingenios azucareros	Cooperativa Productora de Caña de Azúcar	Cultivares
Artemisa	Harlem	Corojal	C132-81 SP70-1284
Mayabeque	Manuel Fajardo	Manuel Fajardo	C86-12 CP52-43 C85-102
Matanzas	Jesús Rabí	Batey 28 de Enero	C86-12 C86-12 C87-252
Villa Clara	George Washington	Victoria de Girón	C1051-73 C86-12
Cienfuegos Sancti Spíritus	5 de Septiembre Melanio Hernández	Carrasco Jesús Menéndez	C86-12 C86-12 C90-317
Ciego de Ávila	Ecuador	Agustín Balmaseda	C87-51 C90-317
Camagüey Las Tunas	Argentina Antonio Guiteras	Abel Santamaría Velazco	C86-503 C86-503 C86-12
Holguín	Fernando de Dios	Jesús Hernández	C90-469 C86-56
Granma	Arquímedes Colina	Carlos Manuel de Céspedes	C87-51 C86-12
Santiago de Cuba	América Libre	El Encanto	C1051-73 C86-531
Guantánamo	Argeo Martínez	Álvaro Reynoso Manuel Sánchez	C88-380 SP70-1284

serológica Inmuno Impresión Directa de Tejidos (7), con el anticuerpo específico anti *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, gentilmente cedido por el Centro Internacional para el Desarrollo Agronómico (CIRAD) de Francia.

Para la lectura o evaluación de la reacción de cada una de las muestras, aplicada a la membrana de nitrocelulosa, se utilizó un estereoscopio con ocular de diez micrómetros (8). La reacción positiva se confirmó con la aparición de puntos de color violeta sobre los

haces vasculares impresos en las membranas de nitrocelulosa. Como controles, se utilizaron positivo CP31-294 (cultivar susceptible infectado) y negativo My5514 (cultivar resistente libre de la bacteria) (9); ambos tienen reacción conocida frente a la enfermedad. El cultivar de caña de azúcar se consideró infectado con la bacteria *L. xyli* si, al menos, uno de los tallos tomados al azar por campo presentara reacción positiva.

Cálculo del porcentaje de infección de *L. xyli* en cultivares comerciales

El porcentaje de infección de la bacteria se calculó mediante la siguiente expresión matemática:

$$I = \frac{TT}{TTM} \cdot 100$$

donde:

I - porcentaje de infección

TT - total de tallos con *L. xyli*

TTM - total de tallos muestreados.

RESULTADOS

Distribución de *L. xyli* en cultivares comerciales y la Colección de Germoplasma

L. xyli posee amplia distribución en las plantaciones cañeras seleccionadas de los ingenios azucareros de Cuba, pues se detectó el patógeno en 26 de los 35 campos estudiados, lo que representa 74,3 %. ([Fig. 1](#))

En las empresas azucareras de Cienfuegos, Sancti Spíritus, Granma, Holguín y Guantánamo, las plantaciones muestreadas tuvieron mayor porcentaje de distribución de la bacteria; mientras que Santiago de Cuba es la de menor porcentaje.

Los resultados del diagnóstico de los genotipos estudiados en la Colección de Germoplasma del INICA, perteneciente a la EPICA de Matanzas, reflejan la presencia de la bacteria *L. xyli* en el 29 %; sin embargo, el 71 % no mostró el microorganismo.

Los genotipos analizados de la Colección de Germoplasma están agrupados en cinco categorías genéticas, según las formas e híbridos en diferentes estados generacionales de caña de azúcar ([Tabla 2](#)): representan el 34,4 % de las formas originales del género *Saccharum*, 45,1 % de los F₁ interespecíficos del género *Saccharum*, 63,2 % de los F₂ interespecíficos del género *Saccharum*, 54,7 % de las cruza regresivas (BC₁) interespecíficas y 11,5 % de otros híbridos.

En las categorías genéticas, los genotipos con presencia de la bacteria no superaron el 35 %, a pesar de que la Colección de

Germoplasma se había cosechado dos veces y propagado durante muchos años de forma sistemática sobre la misma superficie de terreno, sin aplicar medidas de higiene al suelo, instrumentos de cosecha ni material de propagación. De lo cual se puede inferir la presencia constante de inóculo, por lo que los genotipos no infectados se pudieran considerar fuentes resistencia. Deben continuarse los estudios para conocer el comportamiento de los diferentes genotipos que conforman la misma ante *L. xyli* y, de esta forma, recomendar su utilización para implementar líneas de mejora ante la bacteria en el programa de fitomejoramiento de la caña de azúcar en Cuba.

Porcentaje de infección de *L. xyli* en cultivares comerciales

En el año 2011 se estudiaron 12 de los cultivares que ocupan más del 1 % de la superficie plantada de caña de azúcar en Cuba: C86-12 (18,82 %), C86-503 (6,13 %), C90-469 (4,25 %), C90-317 (3,44 %), C1051-73 (3,93 %), C87-51 (4,23 %), CP52-43 (3,65 %), C86-56 (2,77 %), SP70-1284 (2,53 %), C132-81 (1,65 %), C88-380 (2,02 %) y C85-102 (1,19 %) (2). De ellos, diez resultaron positivos a la bacteria *L. xyli* (C86-12, C86-503, C90-469, C90-317, C1051-73, C87-51, CP52-43, C86-56, SP70-1284 y C88-380).

Los cultivares con porcentajes de infección más altos de la bacteria (superior al 90 %) son SP70-1284, C86-12, CP52-43, C87-51, C90-469, C86-56 y C88-380, mientras que no se confirmó la presencia del patógeno en C132-81, C85-102, C87-252 y C86-531 ([Fig. 2](#)). En los cultivares donde no se detectó el patógeno se deben realizar estudios más profundos, ya que este comportamiento puede estar relacionado con algún grado de resistencia de los mismos a *L. xyli*.

DISCUSIÓN

Los problemas fitosanitarios constituyen un factor crítico en la producción de caña de azúcar. Sus características de cultivo semipermanente y de multiplicación vegetativa

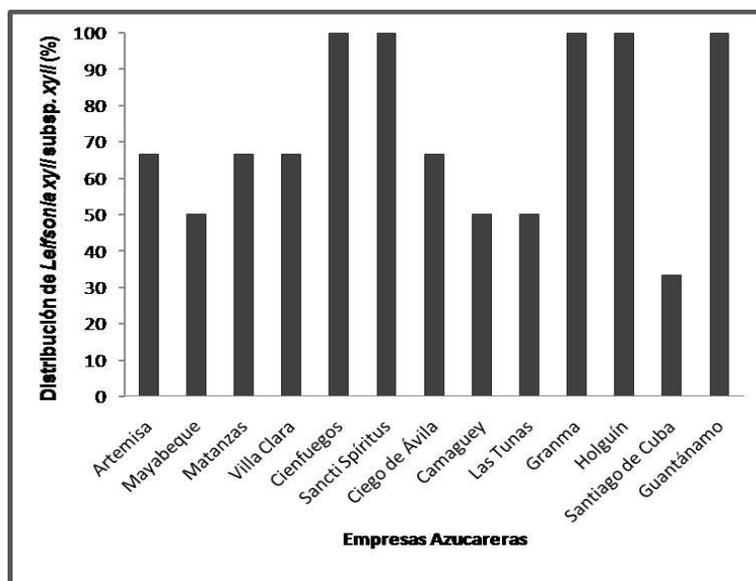


FIGURA 1. Distribución de la bacteria *L. xyli* en las plantaciones de caña de azúcar muestreadas de las empresas azucareras de Cuba. / Distribution of *L. xyli* in the sampled sugarcane plantations in different Cuban sugarcane companies.

TABLA 2. Genotipos de la Colección de Germoplasma de la caña de azúcar donde se diagnosticó la presencia *L. xyli* por Inmuno Impresión Directa de Tejidos. / Genotypes of the sugarcane Germ plasma collection where the presence of *L. xili*. was diagnosed by tissue-blot enzyme immunoassay.

Categorías genéticas	Genotipos				
	Evaluados	Positivos	%	Negativos	%
Formas originales del género <i>Saccharum</i>	77	22	29	55	71
F ₁ interespecíficos del género <i>Saccharum</i>	79	28	35	51	65
F ₂ interespecíficos del género <i>Saccharum</i>	24	7	29	17	71
Cruzas regresivas (BC ₁) interespecíficas	150	35	23	115	77
Otros híbridos	307	95	31	212	69
Total	637	187	29	450	71

favorecen el aumento de la carga de inóculo y la dispersión de los agentes nocivos causantes de enfermedades; constituyen un obstáculo para la obtención de altos rendimientos agrícolas e industriales en la producción azucarera, lo que provoca cuantiosas pérdidas directas e indirectas al cultivo en el mundo (10).

El tratamiento hidrotérmico a la semilla agámica de caña de azúcar es un medio de manejo que se utiliza en Cuba en los Bancos de Semilla Básica y Registrada. Sin embargo, no es totalmente efectivo en el control de esta

bacteria y el material de propagación disemina el patógeno en la nueva plantación y actúa como fuente de inóculo para las vecinas (5). Además, en el país, a pesar de que existe el Servicio Fitosanitario (SEFIT) a la producción, el diagnóstico del raquitismo de los retoños se realiza de forma visual y, hasta el momento, no existe un sistema de detección específico que alerte la presencia del patógeno para realizar las medidas de manejo que se requieran en cada caso (2).

Los resultados en este trabajo concuerdan con los estudios en Irán (4), donde se

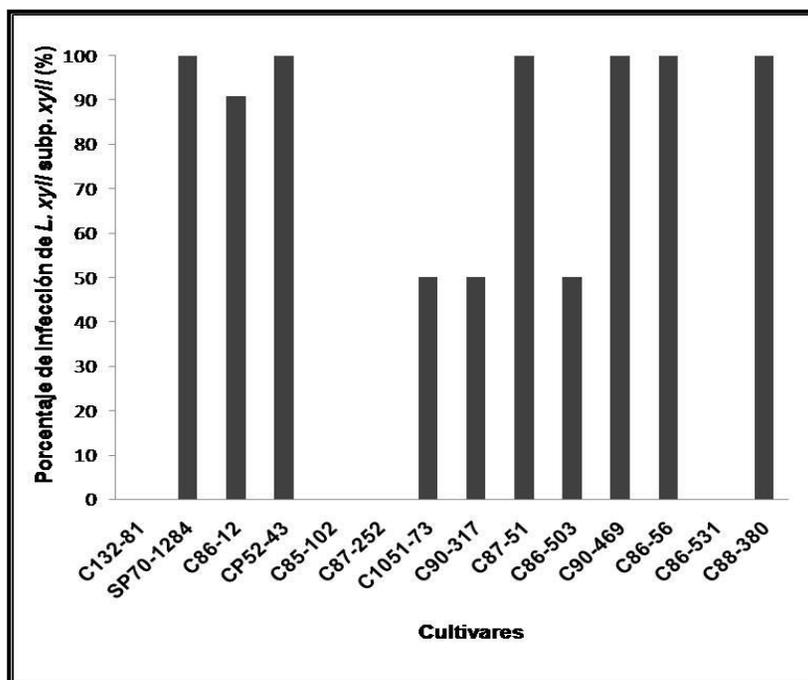


FIGURA 2. Porcentaje de infección de *L. xyli* en cultivares de caña de azúcar en plantaciones seleccionadas de Cuba. / Infection percentage of *L. xyli* in sugarcane cultivars in selected plantations of Cuba.

determinó, con el empleo de la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR de sus siglas en inglés), la presencia del patógeno en las plantaciones encuestadas, con una incidencia superior a 75 %. En Kenia, de 2012 a 2016 la incidencia de la enfermedad solamente era del 37 % (11); sin embargo, en 2009 se detectó en el 23,6 % de campos y 27,1 % en 2010. En el año 2011, en Brasil se reportó 2,8 % (12).

En Cuba, la existencia de posibles fuentes de resistencia en las formas originales de las especies de *Saccharum*, géneros afines e híbridos en diferentes estadios de avance generacional, ya se han informado con el empleo de la microscopía de contraste de fases en la evaluación de un gran número de genotipos de esta Colección de Germoplasma (13).

En Irán se plantea la existencia de un grupo de ancestros comunes, entre los que se destacan los descendientes de *Saccharum officinarum*, que se pueden considerar en los programas de

mejora genética como posibles fuentes de resistencia ante esta bacteria (4).

Es de destacar que en todas las categorías genéticas evaluadas hay posibilidad de encontrar resistencia a *L. xyli* (Tabla 2). En los híbridos se puede trabajar directamente en el establecimiento de cruces comerciales, en tanto en las otras hay que establecer líneas de mejora. En ambos casos se precisa de otros estudios de herencia y habilidad combinatoria de los progenitores para este carácter (14).

Los diez cultivares infectados en este estudio ocupan más del 55 % de la superficie destinada a la caña de azúcar en Cuba (2), por lo que debe existir una estrecha vigilancia sobre los mismos, ya que la presencia de la bacteria influye negativamente en los rendimientos, además es fuente de inóculo para las plantaciones vecinas.

Desde el año 2006 el cultivar C86-12 ocupa los mayores porcentajes de superficie cultivada de caña de azúcar en Cuba con valores superiores al 16 %; el mismo se estudió en 11

de los 35 campos, lo que representa el 31,4 % del total de los muestreados con 90,9 % de infección de la bacteria. Actualmente ocupa 17 % y, aunque en el próximo quinquenio se prevee una ligera disminución, continuará siendo el más extendido (2). En parcelas experimentales con inoculación artificial se categorizó el mismo como intermedio ante *L. xyli* (9); en tal sentido se deben establecer medidas de manejo específicas para este.

Los resultados ponen de manifiesto la necesidad de realizar estudios para conocer la reacción de los cultivares frente a *L. xyli*. Hasta el momento, solo se conoce el comportamiento de C90-469 (intermedio), C90-317 (intermedio), C1051-73 (resistente), C86-56 (intermedio), SP70-1284 (susceptible), C88-380 (altamente susceptible) y C85-102 (intermedio) (9), por lo que se deben priorizar aquellos cultivares que ocupan grandes superficies en las plantaciones comerciales de caña de azúcar, a modo de establecer medidas adecuadas de manejo del cultivo para disminuir su distribución, con vista a evitar la ocurrencia de pérdidas significativas en la producción.

En Cuba se debe establecer una estrategia de manejo basada en la identificación y el diagnóstico de la bacteria, en el empleo de semilla categorizada, la mejora genética de la caña de azúcar, medidas de higiene en las plantaciones y la capacitación de los productores cañeros, aspectos que contribuirán a la disminución de las pérdidas y permitirán mantener altos niveles de producción como una necesidad para cubrir, de manera más viable, la demanda de azúcar. Especial atención se debe tener en el manejo de la Colección de Germoplasma para evitar la pérdida de tolerancia resistencia de los genotipos de mejor comportamiento, lo cual garantiza la variabilidad genética para mantener y potenciar la eficiencia del programa de mejoramiento de la caña de azúcar en el país y como material de intercambio con otras naciones del mundo.

CONCLUSIONES

La bacteria *L. xyli* está ampliamente diseminada en las plantaciones comerciales muestreadas de caña de azúcar en Cuba, pero en bajos porcentajes (29 %) en los 637 genotipos estudiados de la Colección de Germoplasma. Estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de ampliar los muestreos hacia otros ingenios azucareros y cultivares para establecer medidas de manejo de la enfermedad y disminuir los porcentajes de presencia y distribución, además de evitar la pérdida de tolerancia resistencia de los genotipos de mejor comportamiento de la Colección del Germoplasma, lo que garantiza la variabilidad genética de los cultivares obtenidos a través del programa de mejoramiento de plantas.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jean-Claude Girard del Centro Internacional para el Desarrollo Agronómico (CIRAD) en Francia, quien donó el anticuerpo específico anti *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (cabra); al Laboratorio Central del Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar de Cuba, donde se procesaron las muestras; a los especialistas del Servicio Fitosanitario de la caña de azúcar de las provincias y a los de la red de estaciones del Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar de Cuba, que colaboraron en la colecta de las muestras.

REFERENCIAS

- 1- Pérez H, Santana I, Rodríguez I. Manejo sostenible de tierras en la producción de caña de azúcar. La Habana. AZCUBA-INICA. ISBN 978-959-300-029-1. 2013. 290 p.
- 2- Santana I, González M, Crespo R, Guillen S. 2014. Instructivo técnico para el manejo de la caña de azúcar. La Habana. INICA ISBN 978-959-300-036-9. 2014. 302 p.
- 3- Oropeza M, Alonso G. *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, patógeno de la caña de azúcar en Venezuela: agente causal del raquitismo de

- los retoños de la caña de azúcar. Madrid. Editorial Académica Española. ISBN978-3-659-70296-9. 2016. 120p.
- 4- Taher K. Bases metodológicas para el manejo integrado del raquitismo de los retoños de la caña de azúcar en Irán. Santa Clara. [Tesis en opción al grado científico de doctor en Ciencias Agrícolas], Universidad Central de las Villas. 2010. 107p.
 - 5- Lemma A, Tafesse A, Tekle A. Status of ratoon stunting disease (*Lefifsonia xyli* subsp. *xyli*) in the initial seed cane and seed cane fields of Wonji Sugar factory. Global Science Research Journals. ISSN: 2408-6886. 2015. Vol. 3 (2): 213-217.
 - 6- Kazeem S, Ikotun B, Awosusi O, Wintola A, Wada A. Status of ratoon stunting disease of sugarcane (*Lefifsonia xyli* subsp. *xyli*) in Nigeria. Trop Plant Pathol. ISSN 40858-015-0049-1. 2015. Vol. 40: 350-354.
 - 7- Ponte E, Silveira S, Barros J, Moreira R. Incidencia de *Lefifsonia xyli* subsp. *xyli* en áreas de producción de caña de azúcar en Espírito Santo, sur de Bahia y oeste de Minas Gerais. Summa Phytopathologica. 2010. Vol. 36 (4): 313-321.
 - 8- Aday, O. Bases para el manejo de la hoja amarilla de la caña de azúcar en Cuba. Santa Clara. Tesis (en opción al grado científico de doctor en Ciencias Agrícolas), Universidad Central de las Villas. 2016. 114 p.
 - 9- Rufín Y, Pérez R, Gago S, Pellón Y, Delgado M, China A, *et al.* Evaluación de variedades comerciales de caña de azúcar frente al RSD. Cuba & Caña (CU). ISSN 1028-6527. 2012. (1): 65-71.
 - 10- Filippone M, Perera M, Salgado M, García M, Vellicce G, Castagnaro A. Diagnóstico molecular de enfermedades sistémicas de la caña de azúcar en la Argentina: ajuste metodológico y aplicaciones. Revista Industria y Agricultura de Tucumán. 2010. Vol. 87 (2): 01-11.
 - 11- Mutonyi J, Nyongesa H. Incidence and prevalence of ratoon stunting disease (*Lefifsonia xyli* subsp. *xyli*, Evtushenko) in the mumias sugar cane growing zone Kenya. IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science (IOSR-JAVS) ISSN: 2319-2372. 2016. Vol. 9 (11) Ver. II: 28-31.
 - 12- Urashima A, Marchetti L. Incidence and Severity of *Lefifsonia xyli* subsp. *xyli* Infection of sugarcane in Sao Paulo State, Brazil. Journal of Phytopathology. 2013. Vol. 161: 478-484.
 - 13- China A, Pérez G, China A, Cabrera L, Cruz R, Pérez J, *et al.* 2012. Resistencia natural del germoplasma de la caña de azúcar a enfermedades comunes en Cuba. En CD Memorias del evento: Jornada Científico Productiva por el 65 Aniversario de la Estación Provincial de Investigaciones de la Caña de Azúcar "Antonio Mesa". Jovellanos, Matanzas. 15 de noviembre de 2012. ISSN 1028-6527: 10 p.
 - 14- Mesa J, García H, González R, Santana I. 2013. Estrategias y nuevos retos del programa cubano de mejoramiento genético de la caña de azúcar. Revista ATAM (México). ISSN 2007610. 2013. (2): 1-10.