

TURRIALBA

REVISTA INTERAMERICANA DE CIENCIAS AGRICOLAS

VOLUMEN 34

TRIMESTRE ABRIL-JUNIO 1984

NUMERO 2

CODEN: TURRAB 34(2)125-260

<i>Incidencia del virus de la tristeza de los cítricos en Venezuela (en español)</i> G. Plaza, R. Lastra, J. E. Martínez	125
<i>Floración y llenado de frutos en árboles de cacao (Theobroma cacao L.) (Sterculiaceae) en tres sitios de Costa Rica (en inglés)</i> A. M. Young	129
<i>Capacidad de la pulpa del café para la producción de biogás (en español)</i> G. Chacón, J. L. Fernández	143
<i>Actividad fito-estrogénica del trébol blanco in vitro e in vivo y su fluctuación en relación a variables climáticas. Estado metabólico y fermentación ruminal (en español)</i> L. A. Gil, M. C. Díaz, J. Ramírez, M. Mayorga	147
<i>Desarrollo de yemas axilares formadas del cultivo de internudos de plántulas de frijol (Phaseolus vulgaris L.) (en inglés)</i> I. S. Martins, M. R. Söndahl	157
<i>Absorción de ¹⁵N de los fertilizantes en una rotación Allium sativum - Setaria italica en lisímetros (en español)</i> M. A. Lazzari, R. A. Rosell, M. R. Landriscini	163
<i>Caída de frutos de los cítricos después de la floración en Belice. I. Epidemiología de la enfermedad (en inglés)</i> H. J. Fagan	173
<i>Caída de frutos de los cítricos después de la floración en Belice. II. Control de la enfermedad mediante fumigación aérea y del suelo (en inglés)</i> H. J. Fagan	179
<i>Fertilidad de Typic Dystrandeps de Costa Rica. I. Metodología, acidez y cationes (Ca, Mg, K, Fe, Mn, Zn, Cu) (en español)</i> F. Bertsch, A. Cordero, A. Alvarado	187
<i>Fertilidad de Typic Dystrandeps de Costa Rica. II. Aniones (N, P, B, S, Mo), materia orgánica y textura (en español)</i> F. Bertsch, A. Cordero	199
<i>Estudio morfológico y anatómico de semillas y plántulas de Eucalyptus robusta Sm (en portugués)</i> C. M. Beltrati	207
<i>Absorción de nutrimentos minerales por plántulas de maíz (Zea mays L.) según el nivel de fertilización nitrogenada y la cantidad de agua (en inglés)</i> A. J. Tesha, P. Eck	215
<i>Estudio de la antracnosis en guanábana (Annona muricata L.) I. Efecto de la antracnosis en la morfología de las hojas (en español)</i> J. F. Subirós, E. M. Flores, E. Vargas	221
<i>Acción de los reguladores de crecimiento sobre los niveles de proteínas y aminoácidos en soya (Glycine max cv Davis) (en portugués)</i> P. R. C. Castro, O. J. Crocorno	229
<i>Presencia del virus del mosaico del maíz en el Estado de Tabasco, México (en español)</i> M. A. Rocha-Peña, C. T. Montreal, E. N. Becerra, P. Ruiz	233
<i>Algunas propiedades del virus del mosaico severo del maíz identificado en el Estado de Tabasco, México (en inglés)</i> M. A. Rocha-Peña, J. P. Fulton	237
<i>Comunicaciones</i>	243
<i>El rambután (Nephelium lappaceum), composición química del fruto y su conservación (en español)</i> A. J. Ortiz, O. L. Cordero	243
<i>Avances en la introducción de parásitos de Hypsipyla en Trinidad, Indias Orientales (en inglés)</i> M. Yaseen	247
<i>Notas preliminares sobre el barrenador de los brotes terminales del pino Rhyacionia frustrana (Lepidoptera: Tortricidae) en Costa Rica (en español)</i> R. Salazar	250
<i>Efectos del ácido succínico 2,2-dimetil hidrazida (daminozida) en los niveles de hormonas endógenas en semillas inmaduras y en la iniciación floral en manzano (en español)</i> H. Ramírez, G. V. Hoad	252
<i>Interacciones entre el ácido succínico 2,2-dimetil hidrazida (daminozida) y otras hormonas en la iniciación floral del manzano (en español)</i> H. Ramírez, G. V. Hoad	257
<i>Reseña de libros</i>	161, 178, 186, 198, 206, 214, 242
<i>Notas y comentarios</i>	156, 171, 172, 236



INSTITUTO INTERAMERICANO DE COOPERACION PARA LA AGRICULTURA

G. PLAZA*
R. LASTRA**
J. E. MARTINEZ***

Summary

Citrus tristeza virus was detected by ELISA in 53% of the citrus trees tested in Aragua, Carabobo and Yaracuy states. Virus-like particles with the shape and size of CTV were visualized by electron microscopy. The severe symptoms resulted in the decline and collapse of the affected trees. High infestation with the aphid Toxoptera citricida K. was found in all surveyed areas.

Introducción

En Venezuela se plantan comercialmente cerca de 40 000 ha de cítricos, ubicados principalmente en los Estados Aragua, Carabobo y Yaracuy. La mayoría de las variedades sembradas están injertadas sobre naranja agria (*Citrus aurantium* L.) patrón que es preferido por los cultivadores debido a los altos rendimientos, calidad de los frutos y su resistencia a la pudrición de la raíz, causada por *Phytophthora* spp. En los últimos dos años la producción ha descendido debido a la presencia del virus de la tristeza de los cítricos (CTV).

En 1950 se reportó en Venezuela una marchitez en los árboles de cítricos, no obstante, la etiología de la enfermedad no estaba clara, debido a que el diagnóstico se basó solamente en la sintomatología (3). La tristeza de los cítricos (CTV) se menciona por primera vez en Venezuela en 1960, sin embargo la enfermedad estaba restringida sólo a unos pocos árboles en un área pequeña (6). La razón principal para la localización de la enfermedad se debió a que el vector *Toxoptera citricida* K. no estaba presente en el país.

Durante 1975 y 1976, *T. citricida* se identificó en las fronteras con Brasil y Colombia (7), el áfido se expandió rápidamente en Venezuela y hoy en día se encuentran altas poblaciones en casi todas las plantaciones de cítricos. La primera epidemia de la enfermedad comenzó en 1980, en el Estado Yaracuy y el virus fue identificado mediante el injerto a plantas indicadoras, serología y microscopía electrónica (2, 7).

En este estudio se han muestreado las áreas más importantes de producción de cítricos, para determinar la presencia de CTV y su distribución en Venezuela.

Materiales y métodos

Las plantaciones de cítricos fueron muestreadas en las principales áreas cultivadas del país. Se colectaron muestras compuestas de árboles que presentaban síntomas de la enfermedad y de árboles sanos en áreas

¹ Recibido para publicación el 18 de mayo de 1983. Agradecemos al Ing. Agr. Nelson Morgado, Director de Sanidad Vegetal, Ministerio de Agricultura y Cría, por el financiamiento de este proyecto y también a las siguientes personas por su ayuda en la colección de muestras: Roland Mendt, Germán Pérez y Ricardo Castillo, FUSAGRI; Francisco Garrido, Alí Carrillo, Norma de Quintero y Carlos Omaña, Sanidad Vegetal, M.A.C., Edo. Carabobo; Juan Antolini, Sanidad Vegetal, M.A.C., Edo. Aragua; María L. Sosa, Sanidad Vegetal, M.A.C., Edo. Yaracuy.

* División de Sanidad Vegetal, Ministerio de Agricultura y Cría.

** Laboratorio de Virus de Plantas, I.V.I.C., Apartado 1827, Caracas 1010A Venezuela.

*** FUSAGRI, Cagua, Edo. Aragua, Venezuela.

cercanas a éstos. Los brotes jóvenes de 10 cm de largo, se guardaron en bolsas plásticas en hielo hasta llegar al laboratorio para los análisis. Las muestras se guardaron a 4°C y se procesaron a los pocos días de haber sido recibidas.

El tejido de la corteza fue macerado en un mortero o usando un homogeneizador de tejidos (Tissumizer, Tekmar Co., Ohio, USA) a una dilución 1/20 (p/v) en PBS-tween, pH 7.4, conteniendo 2% polyvinylpyrrolidone (PVP-40) para ensayos de inmunoabsorción con una enzima conjugada (ELISA). Para pruebas de inmunodifusión con SDS, el tejido de la corteza fue macerado y diluido 1/20 (p/v) con 0.5% sodio dodecil sulfato (SDS) (5). El antisuero usado en todas las pruebas fue preparado en contra del aislamiento T4 de Florida (enviado gentilmente por el Dr. S. M. Garnsey). La técnica usada para ELISA fue una modificación del procedimiento de Clark y Adams, específicamente para CTV (1). Cada muestra fue analizada por duplicado, utilizándose extracto de corteza de plantas sanas de *Citrus aurantifolia* (CHR) Swingle, provenientes de los invernaderos y bufer PBS-tween pH 7.4, como controles. Los platos de ELISA fueron leídos visualmente y medidos en espectrofotómetro a 405 nm. Lecturas mayores de 0.4 fueron consideradas positivas ya que los controles nunca fueron mayores de 0.2.

En los estudios de microscopía electrónica se utilizó tejido de nervadura central macerado en agua. Rejillas de 400 mesh, cubiertas de una película de colodión y carbón, se flotaron sobre el extracto de tejido, enjuadas y coloreadas negativamente, usando 2% ácido fosfotúngstico (PTA). Las rejillas fueron examinadas en un microscopio electrónico JEOL 100 B.

El virus de la tristeza de los cítricos fue transmitido de plantas sospechosas a plántulas de *Citrus limon* injertando tejido foliar (4); las plantas injertadas fueron colocadas en un invernadero libre de insectos hasta el desarrollo de los síntomas.

Resultados

En los tres estados muestreados se encontraron árboles con amarillamiento general del follaje y anomalías a nivel de la unión patrón-injerto, tales como "panal de abeja" (honey combing), lo que sugirió la presencia de CTV. Algunos de estos síntomas fueron observados en las siguientes combinaciones patrón-injerto: Valencia/naranja agria; Pineapple/naranja agria; California/naranja agria; Valencia/mandarina cleopatra. Algunas de las plantas que mostraban síntomas severos dieron resultados negativos cuando se realizó la prueba ELISA. También algunas plantas aparentemente sin síntomas dieron resultados positi-

vos con la misma prueba, estas plantas mostraron síntomas de la enfermedad en observaciones subsiguientes y algunas veces colapso de las mismas en pocas semanas.

Las plántulas de *Citrus limon*, inoculadas con tejido foliar de algunas de las plantas que mostraban síntomas severos, desarrollaron un aclaramiento de las nervaduras, aproximadamente 5 meses después de injertadas. Las plantas probadas resultaron positivas, cuando se les realizó la prueba ELISA y también se vieron fácilmente las partículas del virus al microscopio electrónico. Los valores de absorbancia considerados positivos para ELISA, fueron entre 0.4-2.3, en todas las pruebas, ya que los valores de los testigos negativos nunca fueron más altos que 0.2. Todas las plantas fueron probadas por el método ELISA, y las que resultaron fuertemente positivas con esta prueba, también reaccionaron con una clara línea de precipitación en las pruebas de inmunodifusión con SDS. Partículas filamentosas características de CTV fueron observadas al microscopio electrónico en preparaciones de extractos provenientes de muestras positivas.

Las edades de los árboles en las plantaciones muestreadas estaban comprendidas entre 5 a 15 años. Todas las infecciones fueron comprobadas durante los últimos dos años. De los tres estados muestreados el más alto porcentaje de árboles infectados fue encontrado en Yaracuy (68.6%), seguido por Aragua (54.3%) y Carabobo (43.8%). No obstante, hay indicaciones de que la enfermedad está también presente en el estado Monagas, al este del país, ya que se ha encontrado el *T. citricida* K. y una sintomatología similar a la de CTV en esa área.

Todas las combinaciones patrón-injerto más comúnmente usadas en Venezuela fueron encontradas infectadas por la enfermedad (Cuadro 1).

Discusión

El virus de la tristeza de los cítricos fue identificado en Venezuela en 1960, la enfermedad estuvo localizada en un área muy pequeña, con muy pocos árboles afectados (6). Una posible explicación para esta localización fue la ausencia en Venezuela de un vector eficiente del virus de la tristeza. Desde 1975 a 1976, cuando al áfido *Toxoptera citricida* K. fue reportado por primera vez en Venezuela, se esperaba un fuerte brote de la enfermedad. En 1980, el mal se encontró por primera vez en plantaciones comerciales (2, 7) y a pesar de las medidas cuarentenarias tomadas para erradicar este brote, la enfermedad se expandió rápidamente. Durante los últimos dos años se ha incrementado la cantidad de árboles afectados en las principales plantaciones de los estados costeros.

Cuadro 1. Especies y número de árboles de cítricos infectados con CTV.

Especie o híbrido/patrón	Número de árboles (positivos/Nº de muestras)			
	Aragua ¹	Carabobo ¹	Yaracuy ¹	Total
Valencia/naranja agria (<i>C. sinensis</i> L./ <i>C. aurantium</i> L.)	95/170	143/296	174/252	412/718
Washington nivel/naranja agria (<i>C. sinensis</i> L./ <i>C. aurantium</i> L.)	13/39	16/87	6/12	35/138
Pineapple/naranja agria (<i>C. sinensis</i> L./ <i>C. aurantium</i> L.)	36/55	55/97	6/6	97/158
Tangor/naranja agria (<i>C. sinensis</i> L. x <i>C. reticulata</i> blanco/ <i>C. aurantium</i> L.)	0/1	0/4	0/1	0/6
Tangor/limón rugoso (<i>C. sinensis</i> L. x <i>C. reticulata</i> blanco/ <i>C. jambhiri</i> Lush)	1/2	-/- ²	-/-	1/2
Valencia/mandarina cleopatra (<i>C. sinensis</i> L./ <i>C. reticulata</i> blanco)	-/-	0/4	-/-	0/4
Total	145/267	214/488	186/271	545/1026

1 Localidades muestreadas: Aragua 57, Carabobo 76, Yaracuy 53.

2 -: no probadas.

La rápida diseminación de la enfermedad, posiblemente se debió a las altas poblaciones de *T. citricida* K. encontradas en todas las áreas muestreadas. Otro factor importante es que la mayoría de los árboles están injertados sobre naranja agria, la cual es muy susceptible a la enfermedad.

Algunas plantas murieron a las pocas semanas después del inicio de los síntomas, sin embargo otras mostraron síntomas suaves y continuaron fructificando. Por lo tanto, existe la posibilidad de que en Venezuela estén presentes diferentes cepas de este virus.

No se estudiaron asociaciones de CTV con otras enfermedades de cítricos, no obstante, la pudrición de las raíces producida por *Phytophthora* spp y síntomas parecidos a los de *Psorosis*, fueron observados en algunas fincas. Estamos conscientes que otras virosis deben estar afectando este cultivo en Venezuela, como es el caso particular de plantas injertadas sobre mandarina cleopatra, que presentan síntomas de virosis, resultando todas las pruebas negativas para CTV. Como este patrón es tolerante a CTV, posiblemente estas plantas deben estar infectadas con otros virus.

En vista de la severidad de la enfermedad y la rápida expansión de la misma, debería desarrollarse un

programa de certificación de yemas y selección de patrones tolerantes a tristeza para Venezuela.

Resumen

El virus de la tristeza de los cítricos fue identificado serológicamente mediante la técnica ELISA, en 53% de los árboles de cítricos examinados en los estados Aragua, Carabobo y Yaracuy. Partículas virales con la forma y tamaño correspondientes al virus de la tristeza fueron observadas al microscopio electrónico, en preparaciones provenientes de plantas que mostraban síntomas de la enfermedad. Los síntomas más severos causaron marchitamiento y colapso de los árboles afectados. Una alta infestación con el áfido *Toxoptera citricida* K. se encontró en todas las áreas examinadas.

Literatura citada

1. BAR-JOSEPH, M., GARNSEY, S. M., GONÇALVES, D., MOSCOVITZ, M., PURCIFUL, D. E., CLARK, M. F. and LOEBENSTEIN, G. The use of enzyme linked immunosorbent assay for

- detection of Citrus Tristeza Virus. *Phytopathology* 69:190-194. 1979.
2. CERMELI, M., MARTINEZ, J. E., LASTRA, R., REYES, F., GERAUD, F. y PLAZA, G. Evolución de la enfermedad conocida como tristeza de los cítricos en plantaciones comerciales de Venezuela. III Seminario Nacional de Fruticultura, Valencia, Venezuela. 1981.
 3. CIFERRI, R. A decline of citrus plants in Venezuela. *Nature* 165:32. 1950.
 4. GARNSEY, S. M. and WHIDDEN, R. A rapid technique for making leaf-tissue grafts to transmit citrus viruses. *Plant Disease Report* 54(10): 907-908. 1970.
 5. GARNSEY, S. M., GONÇALVES, D. and PURCIFUL, D. E. Rapid diagnosis of citrus tristeza virus infections by sodium dodecyl sulfate immunodiffusion procedures. *Phytopathology* 69:88-95. 1979.
 6. KNORR, L. C., MALAGUTTI, G. y SERPA, D. Descubrimiento de la tristeza de los cítricos en Venezuela. *Agronomía Tropical* X(1):3-12. 1960.
 7. MARTINEZ, J. E., LASTRA, R., REYES, F., GERAUD, F., DIAZ, R. y RAMOS, M. La tristeza de los cítricos en plantaciones comerciales de naranja dulce en Venezuela. *Prejornadas Agronómicas*, Maracay, Venezuela, 1980.

FLOWERING AND FRUIT-SETTING PATTERNS OF COCOA TREES
(*Theobroma cacao* L.) (STERCULIACEAE) AT THREE LOCALITIES IN COSTA RICA¹ /

A. M. YOUNG*

Resumen

El patrón mensual de floración y llenado del fruto de un amplio número de árboles de cacao, Theobroma cacao L. (Sterculiaceae) se estudió en tres sitios del Bosque Tropical Húmedo de Costa Rica. Los sitios diferían en su grado de estacionalidad, con un período seco corto normalmente entre enero y marzo. Los árboles de cacao seleccionados se encontraban bajo diversos tipos de sombra. En los tres sitios, sin importar la sombra, se encontró un descenso en la floración cerca del final de la estación lluviosa, cuando la precipitación fue muy alta. Dependiendo de la respuesta de los árboles de sombra a la sequía, la producción de nuevas flores de cacao varió de mes a mes. La floración y el llenado de frutos varió entre árboles mensualmente en todos los sitios, dificultando la cuantificación del patrón estacional y enfatizando el valor de interpretación cualitativa de los datos relacionados con la floración y el llenado de frutos. Cuando la cantidad de sombra se redujo por caída natural de hojas al final de la estación seca, la fluctuación en la producción de flores se incrementó en la siguiente estación lluviosa. En dos sitios se notó un pico alto de llenado de frutos coincidiendo con la elevada floración de la primera mitad de la estación lluviosa. En todos los sitios se presentaron varios picos de floración y llenado de fruto. La interpretación de los diferentes niveles de llenado de fruto depende del efecto de los factores climáticos sobre las poblaciones de insectos polinizadores en los diferentes sitios. La incidencia de la Monilia en los frutos aumentó durante los períodos de buen llenado de frutos y desapareció durante otros períodos del año.

Introduction

Seasonal cycles of rainfall in the tropics constitute a major force shaping the annual phenological patterns of flowering and fruiting in tropical trees (4, 10, 15, 17, 18, 19, 23). The tree species *Theobroma cacao* L. (Sterculiaceae) "Cacao" or "Cocoa", exhibits marked differences in flowering

and fruit-set under widely varying regimes of rainfall, temperature, and humidity both in the field and in the laboratory (21, 22). Changes in photoperiod and temperature interact in complex ways to regulate such phenological patterns in tropical plants (12, 17, 19, 21). The description of flowering and fruit-setting patterns in cocoa under different naturally-occurring regimes of climate is a major prerequisite to understanding the adaptive significance of energy allocation in plants and the role of synchronous flowering on fitness in plant populations (2, 13, 27). This paper reports such patterns for cocoa trees at three localities in Costa Rica.

Study sites and methods

Mature cocoa trees, with established histories of flowering and fruit production were studied at the following three localities in Costa Rica: (1) "La Tirimbina", within 10 km of La Virgen (10°23'N, 84°07'W; 220 m elev.), Heredia Province; (2)

¹ Received for publication on November 11, 1983.

This research was funded by grants from the American Cocoa Research Institute. I thank Drs J. Robert Hunter and Gustavo Enriquez for logistical assistance in the field, and for stimulating discussions on cocoa phenology. Mr. Gordon R. Patterson (Hershey Foods Corporation) and Dr. Edward Ng (M & M Mars, Inc.) provided useful information in cocoa flower physiology. Rafael Quesada and Jesus Sánchez assisted with the field work.

* Invertebrate Zoology Section, Milwaukee Public Museum, Milwaukee, Wisconsin, 53233 USA.

"CATIE" within 3 km of Turrialba (9°54'N, 83°41'W; 602 m elev.), Cartago Province; (3) "La Lola", within 15 km of Siquirres (10°06'N, 83°30'W; 50 m elev.), Limón Province. The "La Tirimbina" locality is within Premontane Tropical Wet Forest, "CATIE" within Lower Montane Tropical Wet Forest, and "La Lola" within Lowland Tropical Wet Forest (11).

At La Tirimbina, two separate cacao farms, "El Uno" and "La Tigra", were studied. One of these (La Tigra) had a broken canopy of advanced secondary growth forest, best described as a sunny habitat with natural canopy. The other plantation (El Uno) had a uniform canopy of *Hevea brasiliensis* rubber trees, and is described as a *Hevea* shaded habitat. At CATIE, the canopy over the cocoa is a mix of planted and naturally-occurring shade trees, and is best described as a "partly shaded habitat". Two cocoa farms at La Lola were studied. One of these, "Area A" consists of a dense uniform shade cover of predominantly *Erythrina* trees, while the other, "Area B", consists of a very broken, disjunct canopy over the cocoa. These areas are considered as "shaded" and "sunny" habitats, respectively. The flowering and fruit-setting patterns of individual cocoa trees were studied in each of these farms as a means of comparing the relative effects of shade cover on these phenologies. Further descriptions of the El Uno and La Tigra farms are given in Young (32, 33) and for La Lola in Trojer (29) and Young (34).

The cocoa trees chosen for study at La Lola were the variety "UF-29", a self-compatible clone that grows well under a variety of conditions. At CATIE, the self-compatible variety "Catongo", with many characteristics similar to UF-29, was chosen. At La Tirimbina, the cocoa trees were of mixed varieties, planted from the same seed stocks in both farms. The trees in all three localities were between 20 and 30 years old.

A series of 20 randomly chosen trees were marked with small yellow plastic tags, each with a code number, in the El Uno farm and a second set of 20 in the La Tigra farm. A total of 52 trees were marked in the same manner in the CATIE farm and 40 trees each in the two areas of the La Lola farm. A monthly census of new flower buds, open flowers, and new fruit (cherelles) was taken for each tagged tree individually in all farms. The census period at El Uno and La Tigra was August 1978 through June 1981; at La Lola it was June 1980 through January 1982. In addition, three sets of 68 tagged trees at La Tigra were sampled in the same manner from July 1980 to June 1981. Two of the three additional sets of tagged trees were located within a few meters of each other

and labeled the "A and B series", while the third set was situated further away from these trees. These additional trees provided an expanded sample of trees in different sub-areas of the La Tigra habitat. These census periods provided a representative sampling of phenological patterns during both wet and dry periods at each locality. One trained worker did all of the sampling at El Uno and La Tigra, and a second trained worker did all of the sampling at CATIE and La Lola. For each area at each locality studied, all of the trees were sampled on the same day, and at about the same time each month. All sampling usually took place between 8:00 am and 1:00 pm.

A census of a tagged trees was accomplished by counting all of the buds, open flowers, and young fruit on each tree. When such a count was completed on a given date, the young fruit (cherelles) were removed and discarded. Thus "young fruit" samples consisted of cocoa pods thirty days or less in age in all samples. The census of such pods was considered to be an adequate measure of fruit-set since even diseased pods within this time interval remain on the tree and can be easily counted. Because fruits represent a carbohydrate-rich physiological "sink" for plant species (1), one that removes a major source of nutrients that would otherwise be available for production of leaves and flowers, the removal of fruits in this study represents a source of bias in the data on levels of flower production. At the La Lola cocoa farms studied, the numbers of young fruit bearing signs of the fungal disease *Monilia roleri* were also recorded, providing information on changes in level of infestation at different times of the year. Symptoms of this disease are readily discerned on infected pods in the field (7). Cherelle wilt was not recorded.

Climatic data were obtained either from CATIE (for both CATIE and La Lola) or courtesy of Dr. J. Robert Hunter for La Tirimbina.

Results

During the census period, the La Tigra cocoa trees sampled produced a total of 126 308 flowers (buds and open flowers combined) and 1 789 new (young) fruit; the El Uno trees during the same period produced 20 473 flowers and 1 247 new fruit. Although flower production was more than six times greater in La Tigra, the levels of fruit production between the two farms were very similar, differing only by about 500 fruit. This production spanned a period of 29 months. The 19-month census period at La Lola yielded a total of 96 933 flowers for both Areas A and B combined, and a total of 26 531 new fruit. The sunny habitat, Area B, produced 55 020

flowers and 13 746 new fruit, while the shaded habitat, Area A, produced 41 913 flowers and 12 785 new fruit during the same period. Even though the sample of trees studied was larger for La Lola than for La Tirimbina (80 and 56 trees, resp.), flower production for all trees studied at La Lola was considerably lower than at the latter locality. The reverse was true for production of new fruit. For the 52 cocoa trees censused at CATIE, a total of 40 684 flowers were counted, and a total of 4 571 new fruit were produced during the 19-month census period. Even though total flower production was slightly less than half that at La Lola for a comparable number of trees, fruit production was proportionately much lower at CATIE than at La Lola for the same time period. As an indication of the effect of shade cover on flowering, a comparison of the March 1982 dry period census of flowers between the shaded and sunny habitats at La Lola reveals considerable difference: 16 735 flowers (418.37 ± 205.13 , $N = 40$) were counted in Area A (shaded

habitat) and only 6 246 flowers (156.15 ± 113.43 , $N = 40$) in the sunny habitat (Area B) on the same day (11 March, 1982 at 4:00 pm).

Tables 1 through 5 summarize the monthly abundances of flowers and new fruit on trees at each locality, and for different cocoa habitats within some localities (La Tirimbina and La Lola). There is a tremendous amount of intertree variation in the numbers of flowers and fruit each month for a given habitat (Tables 1 to 5). Furthermore, the distribution of flowers and fruit vary considerably from month at each locality. These data are characterized further by extremely large standard deviations (at times equal to the average), reflecting a great amount of biological variability in these parameters and tree reproductive behavior, and making it very difficult to determine month-to-month patterns associated with changes in local climatic conditions. At best, the data are examined within the context of tropical

Table 1. Monthly mean abundances of flower buds, open flowers, and new fruit on twenty-eight mature cocoa trees (*Theobroma cacao* L.) in the El Uno cocoa farm in northeastern Costa Rica, August 1978 through January 1981.

Date	Flower buds $\bar{X} \pm S.D.$	Open flowers $\bar{X} \pm S.D.$	Total $\bar{X} \pm S.D.$	New fruit $\bar{X} \pm S.D.$
8 Aug. 1978	8.46 ± 18.65	3.32 ± 6.62	11.78 ± 25.33	1.71 ± 2.85
30 Sept.	1.64 ± 3.71	0.50 ± 1.26	2.14 ± 4.97	0.60 ± 1.28
30 Oct.	1.03 ± 3.86	0.21 ± 0.78	1.24 ± 4.64	0.21 ± 0.49
30 Nov.	1.60 ± 5.90	0.75 ± 2.90	2.35 ± 8.80	0.10 ± 0.41
15 Dec.	2.06 ± 4.91	1.06 ± 3.04	3.12 ± 7.95	0.41 ± 0.98
15 Jan. 1979	3.24 ± 7.40	1.34 ± 3.21	4.58 ± 10.61	0.93 ± 4.07
15 Feb.	6.78 ± 13.63	4.14 ± 8.27	10.92 ± 21.90	0.57 ± 1.10
17 March	20.44 ± 20.79	7.13 ± 8.90	27.57 ± 29.69	1.17 ± 4.65
16 April	58.10 ± 63.69	26.96 ± 30.60	85.06 ± 94.29	1.41 ± 1.88
15 May	43.17 ± 62.72	27.72 ± 45.70	70.89 ± 108.42	1.48 ± 2.06
15 June	5.14 ± 10.92	2.25 ± 5.80	7.39 ± 16.72	0.35 ± 0.98
18 July	23.24 ± 35.53	10.10 ± 19.43	33.34 ± 54.96	0.75 ± 1.26
17 Aug.	24.89 ± 32.87	19.14 ± 29.41	44.03 ± 62.28	0.50 ± 1.20
17 Sept.	42.32 ± 63.61	27.07 ± 41.73	69.39 ± 105.34	0.60 ± 1.34
16 Oct.	17.42 ± 37.77	10.29 ± 19.50	27.71 ± 57.27	0.67 ± 0.88
19 Nov.	7.36 ± 15.80	3.79 ± 7.57	11.15 ± 23.57	0.92 ± 1.46
17 Dec.	7.46 ± 13.23	3.89 ± 5.45	11.35 ± 18.68	0.10 ± 0.55
17 Jan. 1980	17.74 ± 11.46	6.68 ± 10.92	24.42 ± 22.38	0.35 ± 0.81
16 Feb.	18.04 ± 33.65	12.39 ± 25.09	30.43 ± 58.74	0.25 ± 0.63
25 March	6.89 ± 25.20	3.46 ± 13.89	10.35 ± 39.09	0.10 ± 0.40
11 April	9.39 ± 16.64	5.68 ± 10.96	15.07 ± 27.60	0.37 ± 0.80
12 May	8.46 ± 18.57	3.46 ± 7.69	11.92 ± 26.26	0.14 ± 0.58
15 June	13.53 ± 29.12	7.00 ± 16.89	20.54 ± 46.01	0.21 ± 0.61
15 Aug.	21.57 ± 37.54	11.46 ± 22.45	33.03 ± 59.99	0.39 ± 1.01
15 Sept.	28.29 ± 46.95	15.50 ± 27.92	43.79 ± 74.87	0.25 ± 0.57
16 Oct.	28.18 ± 43.90	13.89 ± 22.84	42.07 ± 66.74	0.53 ± 0.86
15 Nov.	17.89 ± 32.98	8.57 ± 20.92	26.43 ± 28.01	0.57 ± 1.14
16 Dec.	10.60 ± 18.31	5.71 ± 10.78	16.32 ± 29.02	0.28 ± 0.64
13 Jan. 1981	19.46 ± 37.98	11.00 ± 25.00	30.46 ± 62.98	0.39 ± 0.85

seasonality in terms of those periods of marked increase or decrease in flowering and fruit-set, that is, a qualitative phenological pattern, rather than by quantitative changes. The extreme variability of these data precludes any meaningful interpretation of possible correlations between flowering and climatic factors in a quantitative sense. Since the beginnings and end points of these data sets are different in some cases, the data are not entirely comparable. Yet when the sample size of trees censused is enlarged, as done for La Tigra cocoa, the same patterns are seen in the expanded data (Tables 6 and 7), indicating that the sample sizes used provide an adequate representation of phenological patterns.

The monthly distribution of flowering is markedly different between El Uno and La Tigra cocoa farms (Figure 1) in relation to the rainfall regime of this locality. In La Tigra, the farm with the broken canopy of native tree species, flower production fluctuates regularly over relatively short periods (1-2 months), with the most noticeable declines in flowering occurring in short periods of reduced rainfall of varying intensity (Figure 1). The trees in this partly sunny and shaded habitat appear to be acclimatized to the prevailing climatic conditions. In marked contrast, flower production fluctuates much more markedly over larger intervals at the nearby El Uno farm (Figure 1). Peaks in flower

Table 2. Monthly mean abundances of flower buds, open flowers, and new fruit on twenty-eight mature cocoa trees (*Theobroma cacao* L.) in the La Tigra cocoa farm in northeastern Costa Rica, August 1978 through January 1981.

Date	Flower buds $\bar{X} \pm S.D.$	Open flowers $\bar{X} \pm S.D.$	Total $\bar{X} \pm S.D.$	New Fruit $\bar{X} \pm S.D.$
7 Aug. 1978	138.21 ± 119.01	35.21 ± 48.13	173.42 ± 167.14	0.89 ± 1.95
30 Sept.	148.82 ± 133.11	67.17 ± 56.87	215.19 ± 189.98	0.96 ± 1.45
30 Oct.	55.14 ± 40.85	21.10 ± 17.50	76.24 ± 58.35	0.78 ± 1.34
30 Mar.	103.35 ± 112.11	63.50 ± 69.49	169.85 ± 181.60	0.50 ± 1.03
15 Dec.	79.06 ± 106.07	50.07 ± 71.06	129.13 ± 177.13	1.39 ± 2.57
15 Jan. 1979	78.12 ± 104.20	45.53 ± 64.32	123.74 ± 162.52	0.75 ± 1.60
15 Feb.	66.00 ± 85.53	39.75 ± 55.09	105.75 ± 140.62	1.46 ± 1.91
17 Mar.	100.53 ± 112.36	63.00 ± 87.24	163.53 ± 199.60	1.50 ± 2.16
15 April	93.80 ± 96.78	46.96 ± 56.65	140.76 ± 153.43	2.00 ± 2.25
15 May	74.56 ± 77.63	38.06 ± 51.29	112.62 ± 128.92	1.53 ± 2.23
19 June	110.77 ± 112.00	53.61 ± 67.53	164.38 ± 189.53	0.77 ± 1.35
18 July	90.35 ± 76.39	71.28 ± 57.00	161.63 ± 133.39	0.78 ± 1.13
17 Aug.	133.42 ± 106.43	79.50 ± 69.76	212.92 ± 176.19	1.34 ± 1.81
17 Sept.	74.03 ± 69.41	47.89 ± 48.19	121.92 ± 147.60	1.60 ± 1.89
16 Oct.	171.63 ± 72.18	97.66 ± 50.79	269.29 ± 122.97	2.00 ± 2.04
19 Nov.	41.04 ± 63.70	28.89 ± 48.38	69.93 ± 112.08	1.07 ± 1.64
17 Dec.	128.14 ± 52.01	86.86 ± 41.59	215.00 ± 93.60	2.03 ± 2.11
16 Jan 1980	78.18 ± 93.64	52.61 ± 66.89	130.77 ± 160.53	0.85 ± 1.38
19 Feb.	57.14 ± 86.99	33.68 ± 56.57	90.82 ± 143.56	1.03 ± 1.42
25 March	101.36 ± 143.98	59.75 ± 97.36	161.11 ± 241.25	0.67 ± 1.58
11 April	77.54 ± 87.97	44.18 ± 64.07	121.72 ± 152.04	0.78 ± 1.26
12 May	78.21 ± 64.95	47.21 ± 47.32	125.42 ± 112.27	1.62 ± 1.78
15 June	114.42 ± 123.38	76.14 ± 81.89	190.56 ± 205.27	0.75 ± 1.32
15 Aug.	134.18 ± 77.09	85.86 ± 54.44	220.04 ± 131.53	1.35 ± 1.51
16 Sept.	146.61 ± 89.26	90.96 ± 59.80	237.57 ± 149.06	1.28 ± 1.04
16 Oct.	138.89 ± 64.43	83.64 ± 46.05	222.53 ± 110.48	1.42 ± 1.04
15 Nov.	53.35 ± 47.94	23.14 ± 21.47	76.49 ± 69.41	1.00 ± 1.16
16 Dec.	24.10 ± 58.27	13.28 ± 38.03	37.38 ± 96.30	0.64 ± 1.28
13 Jan. 1981	8.17 ± 34.70	4.82 ± 21.06	12.99 ± 55.76	0.46 ± 0.90
15 Feb.	6.78 ± 21.09	3.46 ± 13.81	10.24 ± 34.90	0.67 ± 1.10
15 March	13.32 ± 27.94	7.42 ± 18.72	20.74 ± 46.66	0.14 ± 0.44
13 April	38.92 ± 66.64	16.53 ± 30.66	55.45 ± 97.30	0.28 ± 0.58
15 May	53.46 ± 62.36	27.21 ± 42.76	80.67 ± 105.12	0.35 ± 0.76
14 June	69.46 ± 80.75	36.75 ± 47.86	106.21 ± 128.61	1.14 ± 1.94

Table 3. Monthly mean abundance of flower buds, open flowers, and new fruit for fifty-two cocoa trees (*Theobroma cacao* L.) in the CATIE cocoa farm at Turrialba, Cartago Province, Costa Rica, June 1980 through January 1982.

Date	Flower buds $\bar{X} \pm S.D.$	Open flowers $\bar{X} \pm S.D.$	Total $\bar{X} \pm S.D.$	New Fruit $\bar{X} \pm S.D.$
27 June 1980	37.30 ± 40.44	5.75 ± 6.84	43.05 ± 46.49	2.05 ± 3.40
29 July	39.00 ± 33.31	15.34 ± 16.85	54.34 ± 48.14	3.82 ± 3.84
29 Aug.	27.98 ± 25.23	8.11 ± 7.40	36.09 ± 31.86	11.65 ± 11.60
3 Oct.	15.46 ± 13.92	5.73 ± 5.61	21.19 ± 19.06	4.40 ± 5.53
8 Nov.	24.01 ± 30.22	6.67 ± 8.17	30.69 ± 37.97	6.01 ± 7.52
6 Dec.	17.75 ± 22.15	6.71 ± 6.25	24.46 ± 27.55	3.94 ± 4.73
10 Jan 1981	5.42 ± 8.59	3.73 ± 5.89	9.15 ± 14.28	2.32 ± 3.75
6 Feb.	3.25 ± 5.69	3.38 ± 5.97	6.63 ± 11.44	1.29 ± 2.21
5 March	3.38 ± 5.85	1.11 ± 1.95	4.50 ± 7.65	1.82 ± 2.97
6 April	19.54 ± 15.03	7.06 ± 15.67	26.59 ± 30.70	1.21 ± 1.96
9 May	45.09 ± 35.74	9.07 ± 6.83	54.17 ± 41.81	2.61 ± 3.20
8 June	77.96 ± 39.20	20.69 ± 12.30	98.65 ± 50.54	4.80 ± 3.11
10 July	61.65 ± 38.78	17.53 ± 12.23	79.19 ± 49.44	7.17 ± 5.61
10 Aug.	52.23 ± 35.92	26.40 ± 20.43	78.63 ± 54.85	4.19 ± 3.48
5 Sept.	38.57 ± 24.71	19.34 ± 13.48	57.92 ± 37.03	4.63 ± 3.53
19 Nov.	29.46 ± 17.64	7.03 ± 4.10	36.50 ± 20.71	8.34 ± 6.51
16 Dec.	19.32 ± 13.19	3.98 ± 5.63	16.57 ± 24.96	2.25 ± 2.17
14 Jan. 1982	12.21 ± 13.31	3.33 ± 3.50	15.71 ± 16.23	3.23 ± 2.33
16 Feb.	27.54 ± 23.50	8.23 ± 7.46	30.43 ± 35.78	5.92 ± 5.32

Table 4. Monthly mean abundance of flower buds, open flowers, and new fruit on forty mature cocoa trees (*Theobroma cacao* L.) in Area A (shaded habitat) of the La Lola cocoa farm, near Siquirres, Limon Province, Costa Rica, June 1980 through January 1982.

Date	Flower buds $\bar{X} \pm S.D.$	Open flowers $\bar{X} \pm S.D.$	Total $\bar{X} \pm S.D.$	New Fruit $\bar{X} \pm S.D.$
20 June 1980	146.12 ± 92.48	25.30 ± 16.48	170.42 ± 105.76	26.27 ± 18.09
18 July	3.40 ± 5.08	1.25 ± 1.89	4.65 ± 6.41	7.42 ± 6.60
1 Sept.	11.37 ± 13.91	3.05 ± 3.75	14.42 ± 17.18	1.97 ± 2.48
1 Oct.	12.52 ± 14.83	3.95 ± 3.92	16.47 ± 18.33	6.97 ± 5.24
5 Nov.	6.35 ± 7.19	3.75 ± 4.26	10.10 ± 11.05	10.00 ± 12.53
5 Dec.	9.50 ± 9.64	6.47 ± 6.16	15.97 ± 15.16	17.52 ± 16.23
9 Jan. 1981	1.80 ± 2.98	0.60 ± 1.80	2.40 ± 3.60	11.35 ± 17.95
3 Feb.	4.00 ± 7.05	1.80 ± 2.98	5.80 ± 9.83	3.15 ± 4.48
8 March	63.25 ± 49.24	20.70 ± 19.18	83.95 ± 64.99	2.67 ± 4.46
10 April	116.52 ± 92.06	29.37 ± 24.76	145.89 ± 116.82	7.20 ± 10.21
7 May	79.70 ± 43.09	46.42 ± 29.37	126.12 ± 71.29	21.10 ± 15.85
4 June	153.07 ± 96.90	55.57 ± 38.20	208.65 ± 132.91	86.07 ± 90.80
9 July	87.50 ± 51.20	27.25 ± 16.97	114.75 ± 67.06	44.87 ± 42.02
10 August	24.10 ± 17.22	7.12 ± 6.36	31.22 ± 22.94	12.47 ± 9.11
3 Sept.	5.60 ± 8.00	2.40 ± 3.50	8.00 ± 11.01	8.57 ± 6.42
20 Oct.	27.77 ± 18.10	9.75 ± 8.57	37.52 ± 25.87	8.45 ± 5.32
24 Nov.	2.45 ± 3.96	1.10 ± 1.56	3.55 ± 5.16	5.65 ± 4.58
15 Dec.	0.30 ± 0.93	0.02 ± 0.15	0.33 ± 0.95	4.75 ± 3.38
13 Jan. 1982	0.15 ± 0.57	0.15 ± 0.57	0.30 ± 1.13	2.25 ± 1.83
15 Feb.	34.67 ± 22.22	12.35 ± 10.55	47.02 ± 32.01	0.52 ± 1.19

Table 5. Monthly mean abundance of flower buds, open flowers, and new fruits on forty mature cocoa trees (*Theobroma cacao* L.) in Area B (sunny habitat) of the La Lola cocoa farm near Siquirres, Limon Province, Costa Rica, June 1980 through January 1982.

Date	Flower buds $\bar{X} \pm S.D.$	Open flowers $\bar{X} \pm S.D.$	Total $\bar{X} \pm S.D.$	New Fruit $\bar{X} \pm S.D.$
20 June 1980	385.121.85	105.62 ± 55.51	491.00 ± 161.54	3.90 ± 3.36
18 July	21.05 ± 20.64	8.57 ± 8.73	29.62 ± 28.21	9.80 ± 7.74
5 Sept.	15.02 ± 13.79	2.55 ± 2.65	17.57 ± 15.91	21.07 ± 18.19
1 Oct.	12.50 ± 13.55	6.02 ± 4.93	18.52 ± 17.37	19.47 ± 17.60
5 Nov.	10.92 ± 8.64	5.20 ± 3.30	16.12 ± 10.89	32.77 ± 23.41
5 Dec.	4.12 ± 6.00	3.25 ± 4.10	7.37 ± 9.90	26.75 ± 20.56
9 Jan. 1981	0.17 ± 0.63	0.20 ± 0.51	0.37 ± 1.05	10.35 ± 6.67
3 Feb.	0.17 ± 1.10	0.05 ± 0.31	0.22 ± 1.42	1.60 ± 2.99
8 March	17.45 ± 25.65	3.85 ± 7.15	21.30 ± 32.08	0.17 ± 0.67
10 April	137.42 ± 81.89	33.37 ± 21.25	170.80 ± 101.94	5.01 ± 12.53
7 May	48.40 ± 31.64	20.57 ± 14.41	68.97 ± 44.02	11.80 ± 15.05
4 June	135.15 ± 104.01	31.20 ± 24.84	166.35 ± 125.81	22.50 ± 21.78
8 July	84.25 ± 79.87	18.95 ± 13.73	103.20 ± 92.34	30.85 ± 29.25
11 Aug.	81.95 ± 67.86	26.07 ± 17.04	108.02 ± 83.61	15.95 ± 12.81
3 Sept.	34.87 ± 14.95	12.07 ± 6.19	46.95 ± 19.37	8.00 ± 5.30
3 Oct.	25.45 ± 15.20	8.55 ± 7.05	34.00 ± 20.26	26.85 ± 20.26
24 Nov.	19.30 ± 13.44	6.07 ± 5.76	25.37 ± 18.31	22.00 ± 14.80
15 Dec.	0.22 ± 0.76	0.07 ± 0.34	0.30 ± 0.95	6.90 ± 4.18
13 Jan. 1982	0.35 ± 1.02	0.37 ± 1.64	0.72 ± 2.48	4.30 ± 3.61
15 Feb.	22.77 ± 15.06	9.27 ± 4.71	32.05 ± 18.88	3.24 ± 1.05

Table 6. The monthly abundance of flowers and new fruit on an additional twenty-three tagged cocoa trees in the La Tigra cocoa farm in northeastern Costa Rica, July 1980 through June 1981.

Date	Total	Flower buds $\bar{X} \pm S.D.$	Total	Open flowers $\bar{X} \pm S.D.$	Total	Total flowers $\bar{X} \pm S.D.$	Total	New Fruit $\bar{X} \pm S.D.$
30 July 1980	1 621	70.47 ± 70.64	944	41.04 ± 47.41	2 565	111.51 ± 118.05	22	0.95 ± 1.16
30 Aug.	1 662	72.26 ± 64.84	930	40.43 ± 41.31	2 582	112.69 ± 106.15	18	0.78 ± 1.10
30 Sept.	1 063	46.21 ± 46.03	555	24.13 ± 30.42	1 618	70.34 ± 76.45	18	0.78 ± 0.83
30 Oct.	1 582	68.78 ± 54.77	753	32.73 ± 30.21	2 335	101.51 ± 84.98	37	1.60 ± 2.12
30 Nov.	959	41.69 ± 53.83	465	20.21 ± 39.80	1 424	61.90 ± 83.63	20	0.86 ± 0.94
30 Dec.	715	31.08 ± 51.13	301	13.08 ± 27.84	1 016	44.16 ± 78.97	29	1.26 ± 1.32
30 Jan. 1981	378	16.43 ± 49.77	244	10.16 ± 33.96	622	26.59 ± 83.73	3	0.13 ± 0.44
25 Feb.	305	13.26 ± 27.08	153	6.65 ± 16.36	458	19.91 ± 43.44	13	0.56 ± 0.87
30 March	26	1.13 ± 4.06	14	0.60 ± 1.63	40	1.73 ± 5.69	4	0.17 ± 0.81
28 April	1 045	45.43 ± 34.00	418	18.17 ± 19.65	1 463	63.60 ± 53.65	7	0.30 ± 0.74
30 May	1 244	54.08 ± 46.16	635	27.60 ± 26.59	1 879	81.68 ± 72.75	3	0.13 ± 0.33
30 June	1 353	58.82 ± 58.16	688	29.91 ± 30.97	2 141	88.73 ± 89.13	11	0.47 ± 0.87
Totals:	11 953		6 100		18 143		185	
$\bar{X} \pm S.D.$		996.08 ± 520.74		508.33 ± 284.53		1511.91 ± 806.15		15.41 ± 10.25

production coincide with the early and late phases of the lengthy rainy season at this locality, while marked declines in flowering occur immediately following periods of peak abundance. Peak abundance periods are short and associated with the rainy season (Figure 1). During

the dry periods the *Hevea* canopy drops its leaves, and such periods generally precede a period of intense flowering. Peak abundances in fruit-set also occur in the rainy months in both farms (Figure 1), and fruit production is generally well-distributed over successive months, with the noticeable exception

Table 7. The abundance of flowers and new fruit on two intermixed sets of tagged Cocoa trees (N = 45) on the La Tigra cocoa farm in northeastern Costa Rica over several months (July 1980 – June 1981).

Date	Flower buds		Open flowers		Total flowers		New Fruit	
	Total	$\bar{X} \pm S.D.$	Total	$\bar{X} \pm S.D.$	Total	$\bar{X} \pm S.D.$	Total	$\bar{X} \pm S.D.$
A series-marked trees 1-28								
30 July 1980	1 351	51.96 ± 61.86	760	29.23 ± 36.80	2 111	81.19 ± 98.66	9	0.33 ± 0.72
30 Aug.	1 534	56.81 ± 65.54	805	29.81 ± 34.74	2 339	86.62 ± 100.28	36	1.33 ± 2.44
30 Sept.	826	30.59 ± 36.83	393	14.55 ± 20.52	1 219	45.14 ± 57.35	7	0.25 ± 0.84
30 Oct.	978	36.22 ± 41.03	435	16.11 ± 21.29	1 413	52.33 ± 62.32	18	0.66 ± 1.05
30 Nov.	175	6.48 ± 11.18	87	3.22 ± 8.62	262	9.70 ± 19.80	10	0.37 ± 0.72
30 Dec.	0		0		0		0	
30 Jan. 1981	0		0		0		0	
26 Feb.	49	1.18 ± 4.61	11	0.40 ± 1.89	60	2.21 ± 6.50	9	0.33 ± 0.66
30 March	9	0.33 ± 1.18	2	0.07 ± 0.37	11	0.40 ± 1.55	0	
28 April	97	3.59 ± 6.24	35	1.29 ± 2.96	135	4.88 ± 9.20	5	0.18 ± 0.54
30 May	1 518	56.22 ± 43.65	727	26.92 ± 26.44	2 245	83.14 ± 70.09	8	0.79 ± 0.59
29 June	1 819	67.37 ± 53.73	900	33.33 ± 36.64	2 719	100.70 ± 90.37	5	0.18 ± 0.47
Totals	8 356		4 157		12 513		107	
$\bar{X} \pm S.D.$		696.33 ± 686.42		346.25 ± 350.96		1 042.83 ± 90.37		8.91 ± 0.47
B series-marked trees 1-17								
30 July 1980	1 460	85.88 ± 81.16	813	47.82 ± 54.94	2 273	133.70 ± 136.10	10	0.58 ± 1.08
30 Aug.	1 243	73.11 ± 77.81	749	46.81 ± 53.90	1 992	119.92 ± 131.71	19	1.11 ± 1.07
30 Sept.	1 560	91.76 ± 93.56	911	53.58 ± 60.15	2 471	145.34 ± 153.67	8	0.47 ± 0.77
30 Oct.	1 732	101.88 ± 85.79	1 083	63.70 ± 71.29	2 815	165.58 ± 158.08	18	1.05 ± 1.16
30 Nov.	78	4.58 ± 8.35	37	2.17 ± 4.99	115	6.75 ± 13.24	6	0.35 ± 0.96
30 Dec.	5	0.29 ± 1.17	3	0.17 ± 0.70	8	0.46 ± 1.87	6	0.35 ± 0.83
30 Jan. 1981	5	0.29 ± 1.17	2	0.11 ± 0.47	7	0.40 ± 1.64	6	0.35 ± 0.83
28 Feb.	35	2.05 ± 4.26	4	0.23 ± 0.94	39	2.28 ± 5.20	5	0.29 ± 1.17
30 March	0		0		0		0	
30 April	24	1.41 ± 3.03	6	0.35 ± 0.82	30	1.76 ± 3.85	0	
30 May	1 430	8.37 ± 69.81	654	40.87 ± 33.52	2 084	130.24 ± 103.33	0	
29 June	1 732	108.25 ± 78.88	930	58.12 ± 46.45	2 662	166.37 ± 125.33	23	1.35 ± 1.84
Totals	9 304		5 192		14 496		101	
$\bar{X} \pm S.D.$		775.33 ± 760.97		432.66 ± 435.16		1 208 ± 1 193.68		8.41 ± 7.42
overall								
Totals:	17 660		9 349		27 009		208	

of November and December. These months are usually very rainy at La Tirimbina, resulting in both a marked decline in flowering and fruit-set (Figures 1 and 2).

Even though climatic conditions behave rather uniformly over the year at Turrialba, with somewhat noticeable peaks in rainfall occurring in the November-December periods, the most intense flowering occurs in the first half of the rainy season (during June-August) (Figure 3). The least productive period coincides or immediately follows the very rainy months of November and December, with such declines very noticeable in relatively dry periods such as January and February at this locality (Figure 3). The phenological pattern of flowering of the

“Catongo” cocoa at Turrialba matches more closely the observed pattern of flowering in the shaded cocoa habitat (El Uno) at the La Tirimbina locality (Figures 1 and 3). Both habitats have a well developed shade cover and many of the trees at Turrialba exhibit marked deciduousness in the dry months. Periods of maximum fruit set coincide with those rainy months that have high flowering. In the dry months of January and February are also periods of greatly reduced fruit set at this locality (Figure 4).

Maximal flower production is clearly associated in both areas at La Lola with the period March through September, a uniformly rainy period (Figure 5). Moderate to slight buffering of the dry season (January-February) in terms of sustained flowering

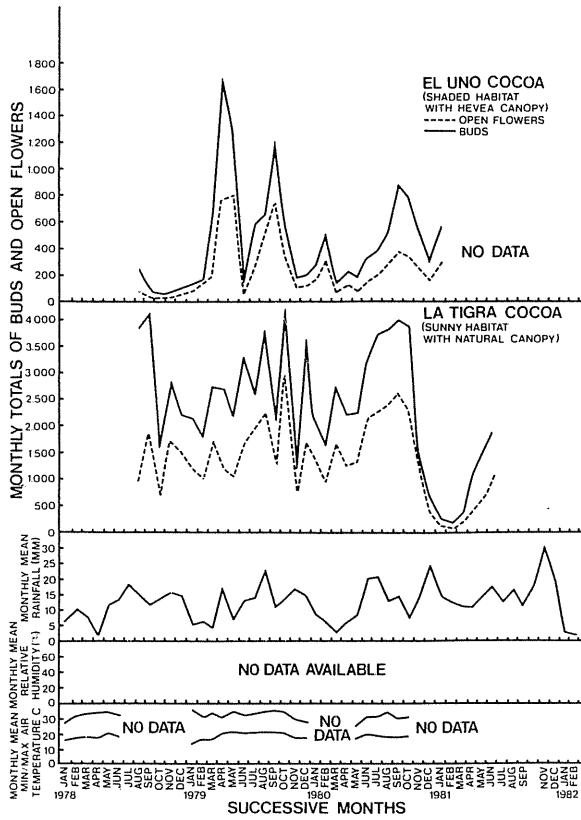


Fig. 1. Phenological patterns in flowering of cocoa trees in relation to local climatic conditions at the El Uno and La Tigra habitats within the La Tirimbina locality in northeastern Costa Rica.

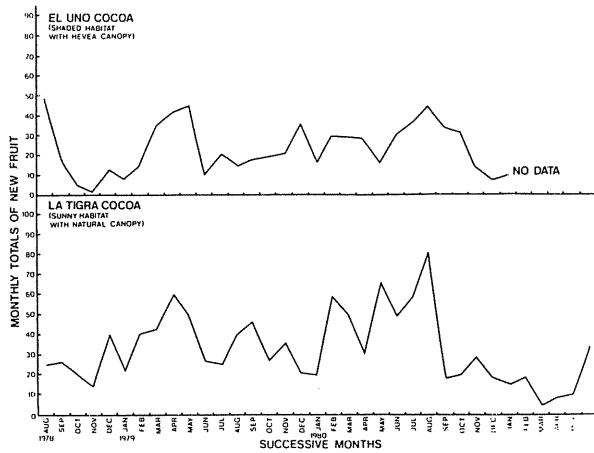


Fig. 2. Phenological patterns of fruit-set (production of cherelles) in the El Uno and La Tigra cocoa tree habitats.

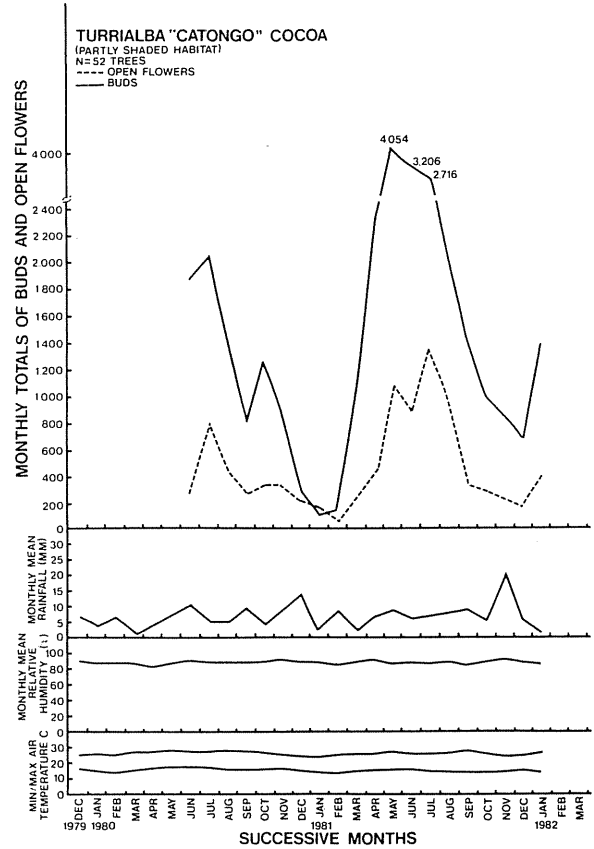


Fig. 3. Phenological patterns in flowering of cocoa trees in relation to local climatic conditions at Turrialba (CATIE), in the central highlands of Costa Rica.

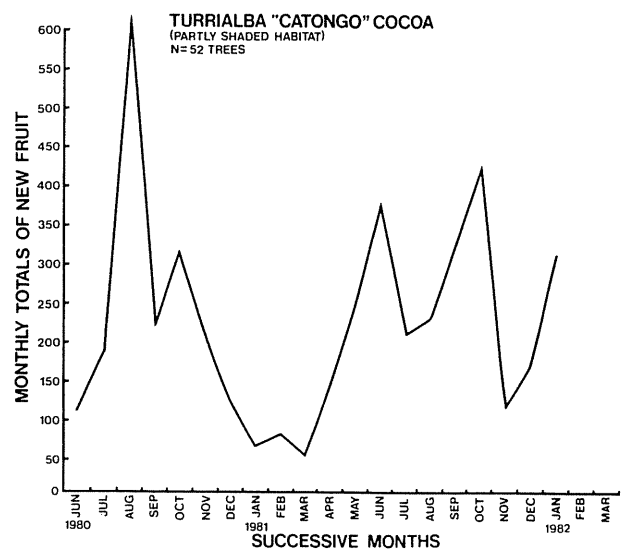


Fig. 4. Phenological patterns of fruit-set in cocoa trees at Turrialba (CATIE).

is most evident in the shaded habitat (Area A) at La Lola, although overall decline in flowering at this time is associated with the rainy months of November and December, as it was at the other localities studied (Figure 5). Peak fruit-set is clearly associated with the early phase of the rainy season, coinciding and immediately following the initial stages of renewed, intense flowering that occurs at this time here (Figures 5 and 6). A second, less pronounced "pulse" of intense fruit-set occurs late in the rainy season, a consequence of the sustained rainy season flowering, and the termination of the first pulse of fruit-set that occurs at the onset of the rainy season here. The marked decline in flowering in the sunny habitat (Area B) at La Lola that occurred between August 1980 and January 1981 coincides with a less marked decline of fruit-set (Figure 6). Overall decline in fruit-set in Area B, however, is much more pronounced than in Area A at the same time, as trees in the more exposed habitat (Area B) may respond more

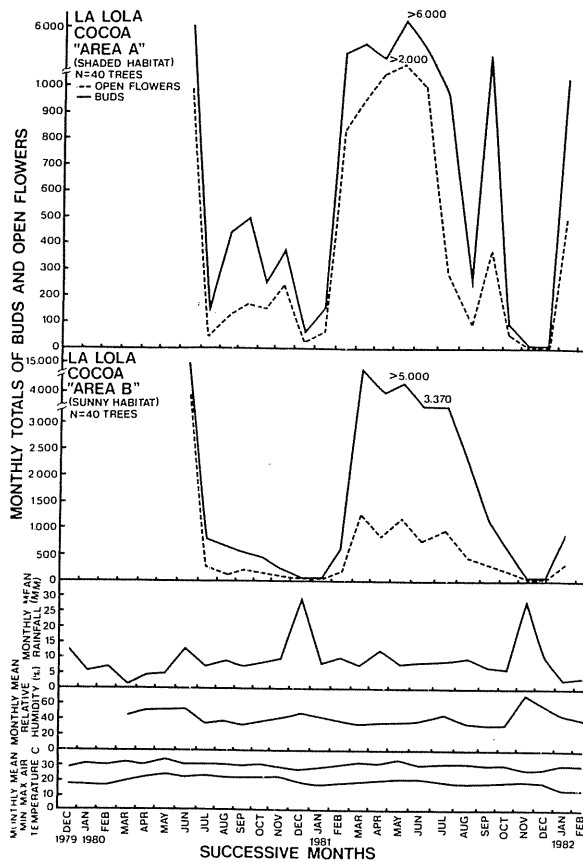


Fig. 5. Phenological patterns in flowering of cocoa trees in relation to local climatic conditions at the La Lola locality, for both shaded (Area A) and sunny (Areas B) habitats, near the Caribbean coast in Costa Rica.

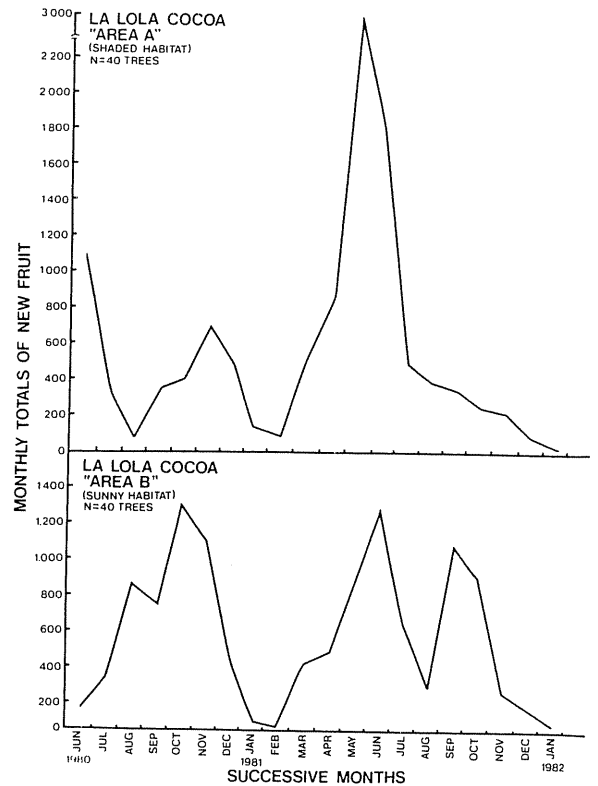


Fig. 6. Phenological patterns of fruit-set at La Lola.

quickly to dry conditions at this time (late December and well into January) (Figure 6). Periods of high fruit-set result in greater infestations of the *Monilia* fungus at these times than in other periods when fruit-set is very low (Table 8).

At all three localities, phenological patterns in rainfall are far more variable than those of other climatic parameters such as minimum-maximum temperatures and relative humidity (Figures 1, 3, and 5).

Discussion

The overall finding of this study is the coinciding of peak periods of flowering in cocoa trees with the rainy season, particularly the first half of this period, at three localities in Costa Rica that vary to some degree in terms of annual cycles of seasonality. A consequence is that fruit-set patterns also fluctuate in direct relation to flowering patterns: periods of high fruit-set coincide with periods of high flower production in cocoa. Oscillations in leaf flushing often complement similar cycles in flowering in cocoa (1). Very rainy conditions at the end of the rainy season results in an enforced decline in flowering, with very low fruit-set occurring in such periods

as well as during the early phase of the dry period which usually follows the wettest months in these localities. The type of shade cover, and the degree to which it is altered by seasonal rainfall conditions, is a secondary influence upon the flowering and fruit-set patterns in *T. cacao*. Intense fluctuations in flowering are seen in *T. cacao* trees covered with either natural shade or planted shade (*Hevea*, *Erythrina*) that become markedly deciduous, with considerable leaf-crop in the dry season, or driest months of the year. Dry conditions in the tropics generally generate marked and regular cycles of leaf-flushing and flowering in a variety of tropical plants (19). When the shade cover over *T. cacao* opens up as the dry season progresses, the cocoa trees receive physiological "shock", sudden, increased insolation, which may trigger flowering by the end of the dry period, or very early into the following rainy season. Trees under a natural shade cover that does not respond as intensely to the dry conditions may exhibit a less pronounced and more irregular response to seasonal changes in rainfall. A shade cover tree such as *Erythrina* may exhibit asynchronous responses to dry conditions (4), which in turn establishes a highly variable canopy over short distances of a cocoa habitat. Slight changes in photoperiod at different times of the year in the tropics may also affect the intensity of flowering and fruiting patterns of some plants (17). Opler *et al.* (19) noted that some tree species in lowland tropical wet forest may have several distinct periods of flowering within a year, and cocoa also exhibits such behavior as shown in the present study for various tropical wet forest sites.

Uniform thick shade cover, such as the *Hevea* canopy at El Uno, dampens overall flower production relative to what occurs in an adjacent cocoa habitat (La Tigra) with a broken, natural canopy. Yet there appears to be very little correlation between levels of flower abundance and overall production of cherelles under these contrasting ecological conditions. Fruit-set in many plants is limited by internal, physiological constraints rather than external factors (27). Thus a confounding factor in this study is the fact that cherelles were removed each month, thus possibly distorting the observed responses of trees to seasonal rainfall patterns. Yet such an effect would presumably be similar for the trees at the three localities studied, thus adding an approximately equal bias to the observed numbers of fruits and flowers in all cases. In spite of this, it is necessary to exercise great caution in interpreting the observed differences in monthly totals of cherelles and flowers within a locality as being solely a response to seasonal changes in the external environment (e.g., rainfall).

Another factor influencing levels of fruit-set is variety of cocoa studied. The mixes of both self-compatible and self-incompatible trees in the El Uno and La Tigra habitats lowers overall pollination frequency when compared with pure stands of self-compatible cocoa (such as the cocoa studied at both La Lola and Turrialba). The relatively much higher fruit production observed at La Lola might be the result of very high pollination frequency within the self-compatible UF-29 variety, very warm temperatures throughout the year, and regular agronomic practices. In contrast, the lower fruit yield at Turrialba might be in part due to the very high elevation of this locality, the associated more uniform cloud cover throughout the year, and intrinsic variety differences between UF-29 and "Catongo" cocoas. Cuatrecasas (5) noted that *T. cacao* requires high air humidity and temperature, adequate shade, and 2 000 – 8 000 mm rainfall annually to thrive optimally, and that elevations above 300 m are generally sub-optimal conditions in most regions. Such differences in locality and the spatial availability of self-compatible and self-incompatible varieties of *T. cacao* may indirectly influence the effectiveness of pollinating insects in determining levels of fruit-set. While some studies have shown that when populations of pollinating insects are sufficient, there is little or no difference in fruit-set levels between self-compatible and self-incompatible plantings of *T. cacao* (see review in Entwistle, 1972), when pollinator populations are experimentally increased, fruit-set sometimes increases (34) suggesting naturally-occurring low abundance of pollinators. Such a condition may result in considerable difference in levels of fruit-set between self-compatible and self-incompatible trees in the same plantation.

Rainfall is most likely the major environmental factor in both timing and spacing the flowering cycles of tropical plants, even though the precise mechanism of triggering the response remains unknown (18). Yet it is very difficult to separate out the effects of rainfall from that of air temperature changes. Overall, the climatic data suggests that decline in rainfall is associated with decline in temperature, although such patterns warrant further study. The timing and spacing of flowering in a tropical plant is also adaptive in relation to the activity of pollinators (18), and the evolution of synchronous flowering may enhance the attraction of pollinating animals (2, 3).

Theobroma cacao exhibits fluctuations in flowering in those cocoa-growing tropical regions where there are marked seasonal patterns in rainfall (1). The evolutionary history of *T. cacao* as an understory tree species of Amazonian rain forest (1) places adaptive constraints on the species in more seasonal regions.

Table 8. The monthly levels of infestation of monilia on new fruit of cocoa (*Theobroma cacao* L.) on eighty trees in shaded (Area A) and sunnt (Area B) habitats of the La Lola cocoa farm, near Siquirres, Limon Province, Costa Rica, June 1980 through January 1982.

Date	Area A				Area B				Area A & B Combined			
	Healthy pods	Infected pods	Total	% Destroyed	Healthy pods	Infected pods	Total	% Destroyed	Healthy pods	Infected pods	Total	% Destroyed
20 June 1980	1 051	48	1 099	4.5	106	50	156	32.1	1 157	98	1 255	7.8
18 July	77	174	251	69.3	385	7	392	1.8	462	181	643	28.1
1 Sept.	79	0	79	0.0	843	0	843	0.0	922	0	922	0.0
1 Oct.	279	0	279	0.0	779	0	779	0.0	1 058	0	1 058	0.0
5 Nov.	298	102	400	25.5	1 103	208	1 311	15.1	1 401	310	1 711	12.3
5 Dec.	441	260	701	37.1	789	281	1 070	26.3	1 230	541	1 771	30.5
9 Jan. 1981	292	162	454	35.6	214	200	414	48.8	506	362	868	41.7
3 Feb.	63	63	126	50.0	36	28	64	43.7	99	91	190	47.3
8 March	38	69	107	64.5	6	1	7	14.3	44	44	114	61.4
10 April	571	5	576	0.8	401	3	404	7.4	972	8	980	0.8
7 May	830	14	844	1.6	472	0	472	0.0	1 302	14	1 316	1.1
4 June	3 409	34	3 443	0.9	895	5	900	0.6	4 304	39	4 344	0.8
9 July	1 666	129	1 795	7.2	1 204	30	1 234	2.4	2 870	159	3 029	5.2
10 Aug.	351	148	499	29.7	622	16	638	2.5	973	164	1 137	14.4
3 Sept.	256	87	343	25.3	260	60	320	18.7	516	147	663	22.2
2 Oct.	212	126	338	37.2	742	332	1 074	30.9	954	458	1 412	32.5
24 Nov.	163	63	226	27.8	621	259	880	29.3	784	322	1 106	29.2
15 Dec.	214	97	311	31.1	276	143	419	34.1	490	240	730	32.9
13 Jan. 1982	90	43	133	32.4	172	70	242	28.9	262	113	375	30.1
15 Feb.	21	5	26	19.2	42	17	59	28.8	63	22	85	25.9

and when the canopy or shade cover is not well developed. Different varieties of cultivated cocoa exhibit differences in the response of flowering to seasonal conditions (1), and some of the observed differences in the present study for cocoa trees at different localities may be related to such an effect. Alvim (1) noted a compensatory effect in cocoa trees: intense fruit-set acts as an energy sink on the tree thereby reducing subsequent flowering. Internal competition for limited nutrients between flowers and young fruits dampens the intensity of flowering at certain times of the year, and superimposes a pattern upon exogenous control by tropical seasonality (1). The observed patterns of decline in flowering at the end of the rainy season at all three localities were in part due to severe flower "knock-down" by heavy rain as well as reduced nutrients at a time when fruit-set had been high. Periods of high fruit production provide the opportunity for increased predation upon fruit by various organisms. Intensely shaded conditions at the end of the rainy season, resulting from both the luxuriance of canopy growth in *T. cacao* and shade trees as well from frequently cloudy conditions, may curtail photosynthetic activity and subsequently flowering in *T. cacao* (20). The observed increase in the frequency of the *Monilia* fungus on cherelles may represent a density-related response by this parasitoid to an increased food supply.

Alvim (1) concluded from work in Bahia, Brazil that flowering in *T. cacao* is inhibited by moisture stress, and that dry periods are times of reduced flowering. The data obtained in the present study provide additional support for this result. The studies of Leston and Gibbs (14) and Gibbs and Leston (8) in Ghana with leaf-flushing in *T. cacao* indicate that trees grown in highly exposed conditions exhibit anomalous responses to seasonal conditions. The observed, sudden shifts in flowering observed in the present study in *T. cacao* when shade cover trees exhibit leaf-drop in the dry season. Janzen (13) predicted that the heavy rains that terminate the tropical dry season provide an effective trigger for the synchronized flowering of trees. Such an effect is most pronounced in highly seasonal tropical regions, even though many tree species exhibit varying degrees of synchronous flowering in less seasonal regions (18). Hilty (10) noted that in relatively non-seasonal tropical localities, flowering and fruiting within a tree species may have multiple peaks of intensity. Hutcheon (12) proposed two different flowering patterns operative in *T. cacao*. A pattern of "normal flowering" is regulated principally by internal physiological conditions, while "crazy flowering" is an immediate response to the removal of some inhibitory factor such as moisture stress

(12). Depending upon the locality, both control mechanisms operate to determine the phenological patterns of flowering in *T. cacao*. Hutcheon also found that the major burst of flowering at the end of the dry season in Ghana results in the greatest amount of fruit-set. A similar pattern was seen with the present study, particularly at both CATIE in Turrialba and both habitats at La Lola. Both of these localities exhibit a greater amount of seasonality in availability of rainfall than the La Tirimbina locality. As the rainy season progresses, there are increasingly less favourable conditions for flowering in *T. cacao* as well as increased energy allocation to fruit development, and both factors contribute to a marked decline in flowering by the end of the rainy season (12). The deliberate removal of new fruit (cherelles) in the present study may also stimulate sustained flowering, thereby postponing or dampening the effects of fruit development on flowering intensity (12).

Temporal changes in the abundance of new fruit *T. cacao* must take into consideration the changes in distribution and abundance of pollinators. When flowering is both intense and synchronous within a population, a greater number of pollinators may be attracted to inflorescences (2, 27). High fruit-set observed during and immediately following periods of intense flowering, as seen in the present study, may result in part from increased activity of pollinating insects. Cocoa-pollinating insects are more abundant during the rainy season than in the dry season (6, 31, 33, 34), allowing for some synchrony between flowers and pollinators. Yet in some regions there exists considerable asynchrony between abundance cycles of cocoa flowers and pollinators and flowers may increase fruit-set to some degree, many trees possess an internal, physiological limit on fruit-set which is independent of pollination levels (27). By inspection the data suggest a difference in the ratio of fruit-set to flowering for some of the trees studied, such as seen in a comparison of these parameters for La Lola and Turrialba. This difference might be due to a direct or indirect effect of locality upon the abundance of pollinating insects and their annual cycles of population dynamics (24, 25, 26). Peak flowering periods in *T. cacao* provide an abundant resource of adult pollinating midges such as *Forcipomyia* species (Diptera: Ceratopogonidae). Pollinator populations are reduced during the dry season, a time when flowering declines as well. The dry season-related abiotic constraints on the survival of *T. cacao* flowers may further limit the opportunities for pollination and fruit-set, since the diurnal cycle of flower opening and receptivity is highly synchronized to times of the day when relative humidity is high (30).

Summary

Monthly patterns of flowering and fruit-set were studied for large samples of cocoa trees, *Theobroma cacao* L. (Sterculiaceae) at three localities within the Tropical Wet Forest zones of Costa Rica. All three localities exhibit varying degrees of seasonality, with a short dry season usually occurring between January and March. Cocoa trees at each locality chosen for study included ones with various kinds of shade cover. At all three localities, and regardless of shade cover, there was a marked decline in flowering near the end of the rainy season when rainfall was very high. Depending upon the response of the shade cover to dry conditions, the month-to-month production of new cocoa flowers varied. Inter-tree monthly levels of flowering and fruit-set varied greatly at all localities, making it difficult to determine quantitative seasonal patterns, and emphasizing the interpretative value of qualitative comparisons involving clearly large differences in flowering and fruit-set data. When shade cover was thinned through leaf-drop by the late dry season, fluctuations in flower production varied greatly in the following rainy season. At two localities in particular, there was a large peak in fruit-set coinciding with the burst of flowering in the first half of the rainy season. Multiple peaks of flowering and fruit-set occurred at all localities. Understanding differences in levels of fruit-set depend upon the effects of climatic factors upon populations of pollinating insects at different localities. The incidence of the fruit disease *Monilia* increased during periods of high fruit-set and disappeared at other times of the year.

Literature cited

1. ALVIM, P. DE T. Cacao. Ecophysiology of Tropical Crops. Alvim, P. de T. and Kozlowski, I. T., eds. New York, Academic Press, 1977 pp 279-313
2. AUGSPURGER, C. K. Reproductive synchrony of a tropical shrub: experimental studies on effects of pollinators and seed predators on *Hybanthus prunifolius* (Violaceae). *Ecology* 62:775-788 1981
3. BAWA, K. S. and BEACH, M. Evolution of sexual systems in flowering plants. *Ann. Missouri Botanical Garden* 68:254-274. 1981.
4. BORCHERT, R. Phenology and ecophysiology of tropical trees: *Erythrina poeppigiana* O. F. *Ecology* 61:1 065-1 074 1980
5. CUATRECASAS, J. Cacao and its allies, a taxonomic revision of the genus *Theobroma*. *Contribut. U. S. National Museum* 35:379-614 1964
6. DE LA CRUZ, J. and SORIA, S. DE J. Estudio de fluctuaciones de polinización del cacao por las mosquitas *Forcipomyia* spp. (Diptera, Ceratopogonidae), en Palmira, Valle, Colombia. *Acta Agronómica* 23:1-17 1973.
7. ENRIQUEZ, G. A. Características y comportamiento de 25 cruces internacionales de cacao (*Theobroma cacao* L.). Tesis Ing. Agron., Universidad Central del Ecuador. Quito, 1963. 150 p
8. GIBBS, D. G. and LESTON, D. Insect phenology in a forest cocoa-farm locality in West Africa. *Journal of Applied Ecology* 7:519-548 1970
9. HARDY, F. The chemical and ecological researches on cacao. *Tropical Agriculture (Trinidad)* 12:175-178. 1935.
10. HILTY, S. L. Flowering and fruiting periodicity in a premontane rain forest in Pacific Colombia. *Biotropica* 12:292-306 1980
11. HOLDRIDGE, L. R. Life zone ecology. Tropical Science Center, San Jose, Costa Rica 1967
12. HUTCHEON, W. V. Physiological studies on cocoa (*Theobroma cacao*) in Ghana. Doct. Dissert. University of Aberdeen, Scotland 1981
13. JANZEN, D. H. Synchronization of sexual reproduction of trees within the dry season in Central America. *Evolution* 21:620-637 1967
14. LESTON, D. and GIBBS, D. G. Phenology of cocoa and some associated insects in Ghana. 3rd International Cocoa Research Conference Accra, 1969. pp 197-204
15. MARSH, C. W. Tree phenology in a gallery forest on the Tana River, Kenya. *East African Agricultural and Forestry Journal* 43:305-316 1978
16. MYERS, J. G. Notes on wild cacao in Suriname and British Guiana. *Kew Bulletin* 1930. pp 1-10

17. NWOKE, F. I. O. Effects of number of photo-periodic cycles on induction and development of flowers and fruits in *Corchorus olitorius* L (var *oniyaya* Epen). *Annals of Botany* 45:569-576. 1980
18. OPLER, P. A., FRANKIE, G. W., and BAKER, H. G. Rainfall as factor in the release, timing, and synchronization of anthesis by tropical trees and shrubs. *Journal Biogeography* 3:231-236. 1976
19. OPLER, P. A., FRANKIE, G. W., and BAKER, H. G. Comparative phenological studies of treelet and shrub species in tropical wet and dry forests in the lowlands of Costa Rica. *Journal of Ecology* 68:167-188. 1980.
20. OWUSU, J. K., ADOMAKO, D., and HUTCHEON, W. V. Seasonal changes in total free sugar content of field cocoa plants. *Physiologia Plantarum* 44:43-47. 1978
21. SALE, P. J. M. Growth, flowering and fruiting of cacao under controlled soil moisture conditions. *Journal of Horticultural Science* 45:99-118. 1970a
22. SALE, P. J. M. Growth and flowering of cacao under controlled atmospheric relative humidities. *Journal of Horticultural Science* 45:119-132. 1970b
23. SMYTHE, N. Relationships between fruiting seasons and seed dispersal methods in a neotropical forest. *American Naturalist* 104:125-135. 1970
24. SORIA, S. DE J. and DE ABREU, J. M. Dinâmica populacional de *Forcipomyia* spp (Diptera, Ceratopogonidae), na Bahia, Brasil. I. Fluctuação estacional dos polinizadores do cacauero relacionada com chuva e balanço de água (Thornthwaite). *Revista Theobroma (Brasil)* 6:47-54. 1976
25. SORIA, S. DE J. and DE ABREU, J. M. Dinâmica populacional de *Forcipomyia* spp. (Diptera, Ceratopogonidae) na Bahia, Brasil. II. Variáveis bióticas relacionadas com a polinização do cacauero. *Revista Theobroma (Brasil)* 7:19-33. 1977a
26. SORIA, S. DE J. and DE ABREU, J. M. Dinâmica populacional de *Forcipomyia* spp (Diptera, Ceratopogonidae) na Bahia, Brasil. III. Variáveis climáticas relacionadas com a polinização do cacauero. *Revista Theobroma (Brasil)* 7:69-84. 1977b
27. STEPHENSON, A. G. Flower and fruit abortion: proximate causes and ultimate functions. *Annual Review of Ecology and Systematics* 12:253-279. 1981.
28. THOMAS, A. The dry season in the Gold Coast and its relation to the cultivation of cacao. *Journal of Ecology* 20:263-269. 1932
29. TROJER, H. El clima y el desarrollo de la producción de cacao en la finca "La Lola". *Cacao, Turrialba, Costa Rica* 13:2-5. 1968.
30. WELLANSIEK, S. J. Flower-biological observations with cocoa (transl.) *Archief voor de Koffiecultuur* 6:87-101. 1932.
31. WINDER, J. A. and SILVA, P. Current research on insect pollination of cocoa in Bahia 1975. *Proceeding, IV International Cocoa Research Conference, Trinidad and Tobago, 1972* pp 553-565
32. YOUNG, A. M. The ineffectiveness of the stingless bee *Trigona jaty* (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae) as a pollinator of cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Journal of Applied Ecology* 18:149-155. 1981
33. YOUNG, A. M. Effects of shade cover and availability of midge breeding sites on a pollinating midge populations and fruit set in two cocoa farms. *Journal of Applied Ecology* 19:47-63. 1982
34. YOUNG, A. M. Seasonal differences in abundance and distribution of cocoa pollinating midges in relation to flowering and fruit set between shaded and sunny habitats of the La Lola Cocoa Farm in Costa Rica. *Journal of Applied Ecology* 20:801-830. 1983

G CHACON*
J. L. FERNANDEZ*

Summary

Degradability of coffee pulp was measured using methanogenic anaerobic fermentation on a laboratory scale of 250 cm³, batch process, and 2.5 cm³, 20 cm³ and 200 cm³ scales in the semi-continuous process.

Yields of biogas/kg ST were 0.15 cm³ under real conditions and 0.20 m³ under ideal conditions. If coffee pulp is left to oxidize for 72 hours or more, no problems are experienced in processing.

Introducción

El propósito de este trabajo es el de estudiar el tratamiento de la pulpa de café, considerada como desecho en Costa Rica (7) y otros países de Centroamérica y Sudamérica, mediante la fermentación anaeróbica metanogénica (9, 10, 13, 14, 15, 18), como una alternativa para solucionar el problema de disposición y aprovechamiento de este subproducto agrícola. Aprovechando las experiencias de los investigadores en la aplicación de la tecnología del biogás a la pulpa de café (3, 6, 11, 17) y con el deseo de aportar la información necesaria para: definir los parámetros de diseño, realizar estudios de factibilidad económica y de planta-piloto, se procedió a realizar esta investigación.

Materiales y métodos

Primer experimento:

En una primera etapa se determinó la capacidad de la pulpa de café, *Coffea arabica* L. de la variedad "Caturra", con 72 horas de oxidación natural después

de cosechado, mediante el procedimiento establecido por Owen *et al.* (12) en digestores discontinuos de 250 cm³ (Figura 1a)

El inóculo empleado fue el efluente de un digestor iniciado con estiércol de vaca y que trabajó seis meses con pulpa de café y se dejó inactivo por doce meses.

Se realizaron veinte pruebas usando como variables: la temperatura entre 20 y 35°C, la concentración inicial de sólidos totales (ST) entre 0.1 y 0.4% ST, la concentración de nutrimento entre 0.08 y 0.16 kg de fosfato de amonio/m³ y la concentración de inóculo de 5 a 20 % en volumen.

Segundo experimento:

Como segunda etapa se realizaron 16 ensayos en los digestores discontinuos de 250 cm³ (Figura 1a) pero sin seguir el procedimiento de Owen *et al.* (12)

Se estudió el efecto de la temperatura, la concentración de nutrimentos y de inóculo en los mismos ámbitos del primer experimento. La concentración de sólidos totales (ST) se varió entre 0.1 y 0.4%. Se realizaron cuatro pruebas sin el pretratamiento de 72 horas de oxidación

Tercer experimento:

Siguiendo el procedimiento usado por Morales y Chacón (10) y un fermentador de 2.5 dm³ (Figura 1b), se efectuó un experimento durante dos meses y

¹ Recibido para publicación el 20 de abril de 1983.

Se agradece a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica por la financiación de este proyecto. Se contó con la colaboración de la Ing. Juana Ma. Coto de la Universidad Nacional en el primer experimento y con la Dra. Ana I. Morales de la Oficina del Café en el tercer experimento.

* Escuela de Ingeniería Química, Universidad de Costa Rica.

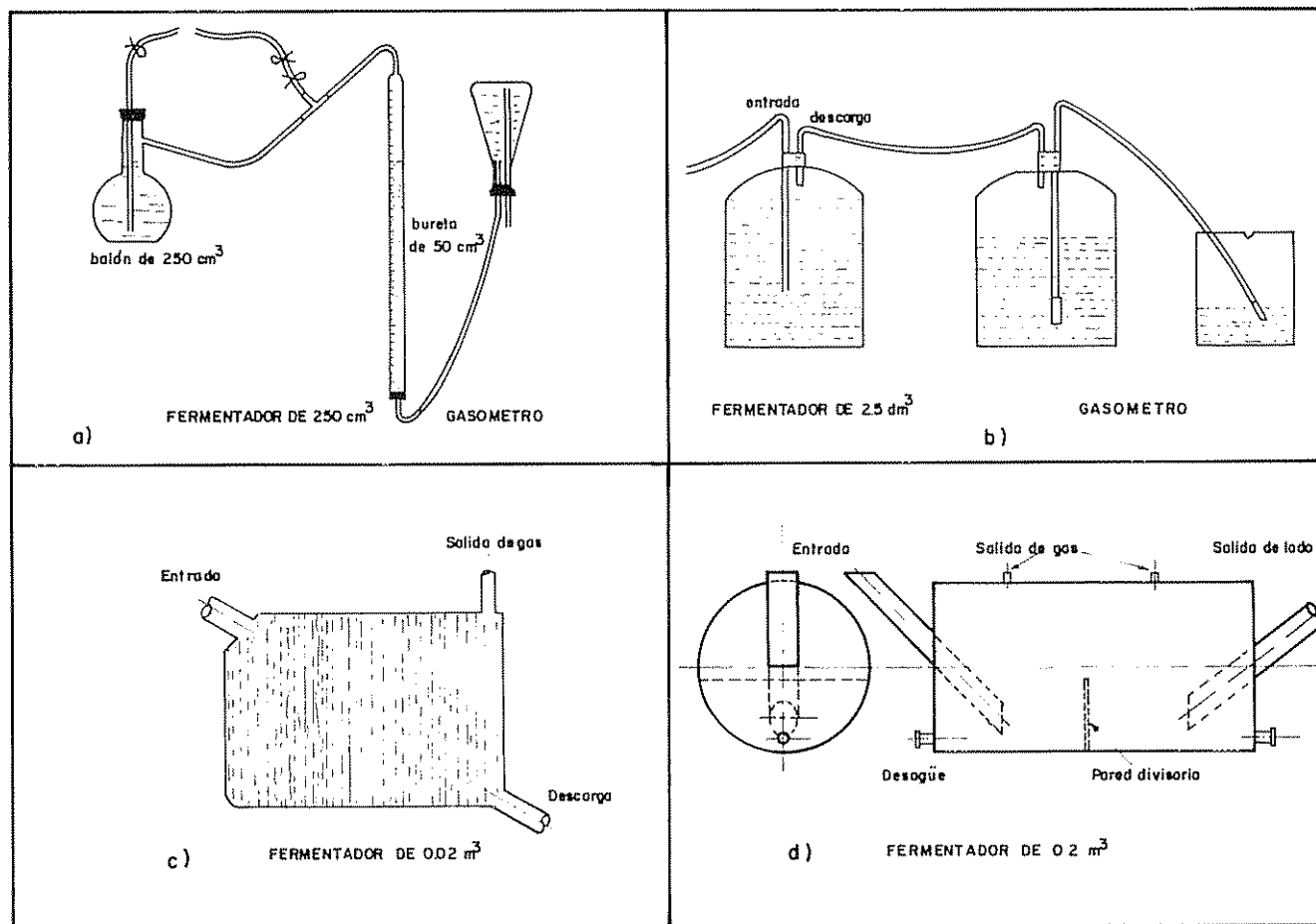


Fig. 1 Equipos usados en la investigación sobre la capacidad de la pulpa de café en la producción de biogás. (No están a escala)

medio, usando una carga de 167 g de pulpa por día con el agua necesaria para tener 10% de sólidos totales, lo que establece un "tiempo de retención hidráulico" de 30 días. La pulpa usada recibió el pretratamiento mencionado empleando el mismo. Se llevó a cabo al mismo tiempo que los otros dos experimentos. La temperatura durante la corrida fue de $23 \pm 3^\circ\text{C}$. El inóculo se formó con 1/3 del inóculo original (tres meses después) y 2/3 de agua dando una concentración de 1.5% ST.

Cuarto experimento:

Se realizó una corrida de tres meses en un digestor semicontinuo de 20 dm³ (Figura 1c), con pulpa cuyo fruto había sido cosechado una semana o más, antes. El inóculo fue el mismo. La temperatura de la corrida se mantuvo entre $22 \pm 3^\circ\text{C}$.

Quinto experimento:

Como paso previo al estudio en planta-piloto se realizó un experimento en un digestor de 0.2 m³ (Figura 1a).

La pulpa usada se extendió en una superficie de concreto y se dejó al ambiente durante 72 horas, antes de introducirla al fermentador.

El inóculo se formó con mezclas de estiércol de vaca, una parte de estiércol y una de agua, dando una concentración de 8.5% de sólidos totales. Al cabo de dos meses de funcionar se comenzó a agregar la cantidad de pulpa necesaria para obtener el "tiempo de retención deseado". Después de otro mes, se inició la toma de datos los cuales demostraron estabilidad a partir del tercer mes.

En los experimentos cuarto y quinto se midió la producción de gas en un aparato tipo "West test meter" de la casa G C A /Presition Scientific, con una capacidad de 3 m³ de gas

Los sólidos totales (ST) se midieron mediante los procedimientos de la APHA y la AWNA (1, 2)

La composición del gas se midió en un equipo de análisis de gas tipo Orsat, de la casa Fisher, modelo 10-616 Se determinó CO₂, la posible contaminación con O₂ y se comprobó la presencia de CH₄ con un error del 20%.

Resultados

En el Cuadro 1 se resumen los resultados obtenidos en la investigación, así como otros datos de operación.

En el primer experimento se obtuvo un rendimiento de 0.196 ± 0.018 m³ de biogás/kg ST. Los cambios en temperatura, en concentración de la masa reactiva, de nutrimentos, y de inóculo, no presentaron efectos significativos en el valor del rendimiento

La variación de la producción de biogás con el tiempo a partir de pulpa de café, se puede reproducir mediante la relación:

$$V = M \cdot [1 - \exp -K \cdot t \cdot (t - r)] \quad (1)$$

Donde V es el volumen producido, M es el volumen total al final del proceso, t es el tiempo transcurrido, K es una constante denominada indicador de velocidad y r es otra constante denominada tiempo de retardo

El indicador de velocidad varía con la temperatura así:

$$K = 0.002265 \cdot (T - 15.1) \quad (2)$$

La temperatura T en °C, varía en un ámbito entre 25 y 35 grados Celcius y K está dado en días⁻¹. El tiempo de retardo varía con la temperatura de la siguiente forma, aproximadamente.

$$r = 0.193 \cdot (T - 35.8) \quad (3)$$

en donde: T en °C y r en días

En el segundo experimento, de los cuatro ensayos se realizaron sin pretratamiento, tres no produjeron gas. Solamente produjo gas el que tenía más inóculo, 20% en volumen y mayor temperatura, 35°C. Los demás produjeron 0.165 ± 0.082 m³ de biogás/kg ST

De los datos obtenidos se puede estimar que el tiempo de proceso cuando se alcanza el 99% de su máxima producción, es de 32 días a 20°C, de 25 a 25°C, de 20 a 30°C y de 15 a 35°C

Los otros tres experimentos mostraron estabilidad en los valores presentados en el Cuadro 1

Discusión

La pulpa de café es capaz de descomponerse mediante la fermentación anaeróbica metanogénica, como lo hacen la mayoría de los sustratos que han sido utilizados para este propósito si se deja oxidar durante 72 horas como pretratamiento. Al igual que otros materiales, la variación en la concentración de sólidos totales y de inóculo no influyen en el comportamiento de la producción de biogás. La pulpa de café no carece de nitrógeno para la fermentación, pues no es afectada por los cambios de concentración en este nutrimento. Los cambios de temperatura producen una variación proporcional en la velocidad de la producción del gas, pero no producen variación significativa en el rendimiento

El rendimiento de biogás representa un 60% del valor que tradicionalmente se toma como referencia.

Cuadro 1. Capacidad de la pulpa de café para la producción de biogás.

Experimento No.	Tipo de proceso	Volumen del fermentador dm ³	Rendimiento de biogás m ³ gas/kg ST	Sólidos totales carga %	Flujo de masa kg/día	Sólidos totales salida %	CH ₄ (**)%	Tiempo de retención días	Duración del experimento meses
1	"batch"	0.250	0.196 ± 0.018	0.1 a 0.4	—	—	70	—	—
2	"batch"	0.250	0.165 ± 0.082	0.1 a 0.4	—	—	70	—	—
3	continuo	2.5	0.150 ± 0.045	9.4 ± 0.9	0.08	2.2 ± 0.4	70	30	2.5
4	continuo	20	0.178 ± 0.088	2.6 ± 0.9	0.57	0.69 ± 0.36	68	35	3.0
5	continuo	200	0.163 ± 0.099	6.3 ± 1.0	6.67	1.9 ± 0.7	66	30	5.0

NOTA: (**) Composición estimada

que es de 0.3 m³ de biogás/kg ST (9, 11, 13-15). Esta diferencia se explica por el alto contenido de lignina, 27.3% en base seca y de proteína lignificada, 4.7% (4), que son inertes a la acción microbiana. El rendimiento es relativamente bajo si se compara con el de otros materiales, lo que indica que se debe realizar un estudio de factibilidad económica previo a recomendar el uso del proceso de fermentación anaeróbica en el tratamiento de la pulpa de café. Según los datos de Matamoros (8) y el rendimiento obtenido en esta investigación, un beneficio de café satisfaría un 60% de su demanda energética, si se utiliza toda la pulpa producida en la producción de biogás.

El modelo que representa la velocidad de producción volumétrica de biogás, inferido en este trabajo y descrito por la ecuación [1] expresa adecuadamente el comportamiento del proceso, aunque se debe comprobar para otros materiales complejos antes de generalizarlo.

El tiempo de retardo (r) manifestado en la misma ecuación [1], no mencionados por ningún autor, probablemente se deba a que se usó un inóculo suficientemente inactivo; se debe observar, que este valor tiende a desaparecer cuando aumenta la temperatura.

Resumen

Se investigó la degradabilidad de la pulpa de café mediante la fermentación anaeróbica metanogénica a escala de laboratorio de 250 cm³ en proceso discontinuo ("batch") y a escalas de 2.5, 20 y 200 dm³ en proceso semicontinuo. Se obtuvo rendimientos desde 0.15 a 0.20 m³ de biogás/kg de sólidos totales, en condiciones reales e ideales respectivamente. Si la pulpa de café se deja oxidar durante 72 horas o más, no presenta problemas durante el proceso.

Literatura citada

1. A.P.H.A. Standards Methods for examination of water and waste matter. American Public Health Association, 14a ed., Washington, 1975.
2. A.W.W.A. Control de calidad y tratamiento de aguas. American Water Works Association. Instituto de Estudios de Administración local, Madrid, 1975.
3. BERN, S. Utilización de la pulpa de café en la producción de gas combustible, biogás. Instituto de Recursos Hidráulicos y Electrificación (I.R.H.E.), Panamá, 1980.
4. BRAHAM, J. E. y BRESSANI, R. Pulpa de café: composición, tecnología y utilización. C.I.I.D., Bogotá, 1972.
5. CALLE, A. Subproductos del café. Boletín técnico No. 6. CENICAFE, Bogotá, 1977.
6. CALZADA, J. F. *et al.* Biogas from coffee pulp. *Biotech Letters* 3(12):713-716, 1981.
7. JIMENEZ, A. Leyes y reglamentos usuales sobre el café. Trejos Hnos. Sucrs. S.A., San José, 1978.
8. MATAMOROS, M. A. Factibilidad para la producción de biogás. Proyecto de Graduación, Escuela de Ingeniería Química, U.C.R., 1981.
9. McCARTY, P. L. Anaerobic waste treatment fundamentals. *Public Works*: Sep., 1964; pp. 107-112. Oct., 1964; pp. 123-126. Nov., 1964; pp. 91-93. Dec., 1964; pp. 95-99.
10. MORALES, A. I. y CHACON, G. Producción de biogás a partir de pulpa de café. OFICAFE, San José, 1981.
11. N.A.S. Methane generation from human, animal and agricultural wastes. National Academy of Sciences, Washington, 1977.
12. OWEN, W. F. *et al.* Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. *Water Research* 13:485-492, 1979.
13. PYLE, D. L. Technical options in anaerobic digestion. Department of Chemical Engineering and Chemical Technology, Imperial College, Londres, 1976.
14. STADMAN, T. C. Methane fermentation. *Annual Review of Microbiology* 21: 1967.
15. STAFFORD, S. A., HAWKES, D. L. y HORTON, R. Methane production from waste organic matter. C.R.C. Press, Miami, 1978.
16. TRAVELYAN, W. E. The methane fermentation. *Tropical Science* 17(4):193-209, 1975.
17. YOUNG, M. A. Biometanización de la pulpa de café; alimentación alternada o mezclada con estiércol bovino. Simposio Internacional, Avances en fermentación Anaeróbica, UNAM México, 1982.
18. ZEIKUS, J. G. The biology of methanogenic bacteria. *Bacteriological Reviews* 41(2):514-541, 1977.

ACTIVIDAD FITO-ESTROGENICA DEL TREBOL BLANCO *IN VITRO* E *IN VIVO*
Y SU FLUCTUACION EN RELACION A VARIABLES CLIMATICAS, ESTADO
METABOLICO Y FERMENTACION RUMINAL¹ /

L. A. GIL*
M. C. DIAZ*
J. RAMIREZ*
M. MAYORGA*

Summary

There is no clear understanding of estrogen activity in white clover, nor its effects on animal fertility. Because this plant is a major protein source for livestock in Latin America, estrogen activity was measured during a one-year cycle, using methods for comparing radioactivity. Estrogen levels rose with rainfall, sunshine and ruminal fermentation, but was unaffected by environmental temperature and grazing.

In order to determine whether estrogen activity measured in vitro affected animal fertility, several reproductive parameters of the female mouse were measured after feeding the animal clover extracts, either in liquid form or in two injections. Estrus cycles were drastically lengthened in estrus and diestrus and fertility was suppressed. These effects were similar in both the injected application and the oral application, although accumulated oral doses contain one hundred times the amount in injected doses. The fermented extract, administered orally, appears to have affected fertility more than the unfermented extract, but parenteral action was undifferentiated.

Introducción

La baja fertilidad del ganado lechero de la Sabana de Bogotá, es uno de los mayores obstáculos en el desarrollo de esta industria. Entre las principales causas que se mencionan, están las deficiencias nutricionales y errores en el manejo reproductivo. Dado que en las praderas de esta región abunda el trébol blanco (*Trifolium repens* var. Ladino), fue necesario investigar si éste contiene estrógenos, que pudieran interferir con el comportamiento reproductivo del ganado.

Ciertas especies de trébol contienen estrógenos que afectan la fertilidad de los animales, entre ellas

Trifolium subterraneum (4, 17, 27), *Trifolium pratense* (6, 11, 14, 30), y *Trifolium repens* var. Ladino (26).

Las investigaciones realizadas en diferentes países en relación al trébol blanco, son contradictorias en lo referente a su actividad estrogénica. Bickoff *et al.* (6), determinaron que posee cumestrol, una sustancia estrogénica bastante activa. Newton y Betts (18) y Lindner (16), mencionaron débil estrogénica, mientras que Bennett *et al.* (3), no encontraron actividad estrogénica en esta variedad de trébol.

El presente trabajo tuvo como objetivo medir *in vitro* la actividad estrogénica del trébol blanco (*Trifolium repens* var. Ladino), durante un ciclo anual de crecimiento en dos praderas del altiplano de Bogotá, situadas a una altura de 2 600 msnm, y relacionar los valores estrogénicos con tres variables climáticas, con la edad de la planta y con el efecto de la fermentación *in vitro* mediante microorganismos del rumen.

¹ Recibido para publicación el 30 de marzo de 1983.
Se agradece al Organismo Internacional de Energía Atómica, OIEA, de Viena, por su apoyo financiero.

* Instituto de Asuntos Nucleares, Bogotá, Colombia.
Apartado Postal 8595, Bogotá, Colombia.

La segunda parte de este estudio, fue corroborar *in vivo* la actividad estrogénica medida previamente *in vitro*. Con tal fin, se examinó el efecto de extractos acuosos del trébol, sobre el ciclo estral, la receptividad sexual y la fertilidad del ratón hembra

Materiales y métodos

Material vegetal

El trébol bajo estudio crecía en asociación con pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) en dos praderas colindantes: una fue pastoreada rotativamente permitiéndole periodos de recuperación, la otra se mantuvo sin ganado durante todo el periodo de muestreo. La población de tréboles en la pradera pastoreada estaba distribuida en zonas discretas, donde alcanzaba alturas superiores a las del pasto kikuyo, al final de los periodos de recuperación. En la pradera no pastoreada el tamaño del trébol fue siempre inferior al del kikuyo, el cual impidió una adecuada iluminación

Las muestras representativas de cada pradera fueron colectadas cada ocho días, entre marzo de 1979 y febrero de 1980. Este material se secó en estufa de aire forzado a 60°C por 48 horas. La materia seca fue determinada por secamiento total a 100°C por 48 horas. Las muestras secas se molieron con un molino Willey hasta polvo fino y se conservaron en recipientes herméticos

Extracción y fermentación

El polvo de trébol se sumergió en un exceso de agua, con agitación ocasional, durante 48 horas a 39°C y luego se exprimió entre gaza. Finalmente se adicionó agua para lograr las concentraciones requeridas

La fermentación consistió en incubar anaeróbicamente trébol seco con solución de McDougall y fluido ruminal filtrado (inóculo), a 39°C por 48 horas (29). El inóculo fue obtenido de una vaca con fistula en el rumen que pastaba tréboles y kikuyo. Los valores de estrógenos de los testigos en que como sustrato se usó papel filtro molido se sustrajeron de los valores de las muestras respectivas

Terminado el tiempo de extracción o fermentación, las muestras fueron centrifugadas a 2405 x G, separando los sobrenadantes a los cuales se les determinó la actividad estrogénica

Los extractos inyectables se isotonizaron con cloruro de sodio y se esterilizaron por filtración a través de una membrana miliporo (0.22 µ)

Cuantificación de la actividad estrogénica

Los anteriores extractos fueron incubados *in vitro* a 4°C y 18 horas, en presencia de una cantidad constante de 17-β-Estradiol-³H y una cantidad constante de citosol que contenía receptores específicos para estrógenos. La curva de calibración se elaboró incubando concentraciones entre 0 y 1280 pg de 17-β-Estradiol frío (E).

La valoración de cada muestra, se realizó extrapolando sobre la curva de calibración el porcentaje de radiactividad ligada al citosol, después de sedimentar la fracción de hormona no ligada adsorbida a gránulos de carbón recubiertos con dextrano (15)

El citosol se obtuvo por ultracentrifugación de un homogenizado de úteros de conejas adultas a 105000 x G durante 90 minutos a 4°C (9)

Efecto sobre ratones hembra

Se usaron ratones hembra púberes, cepa Suiza, aproximadamente de 8 semanas de edad y con pesos de 24 a 30 g. Se mantuvieron en grupos de 10 animales por jaula a 22°C y se sometieron a 10 horas de luz artificial y 14 horas de oscuridad diariamente

Los ratones consumieron una dieta balanceada, que fue modificada durante el experimento, por carencia de ingredientes, causando disturbios sobre el ciclo a todas las ratonas. El agua y los extractos fueron suministrados permanentemente. Se consideró como dosis administradas al promedio de las dosis bebidas durante los 25 días de tratamiento.

En los experimentos por vía intraperitoneal se administró a cada animal en diestro dos inyecciones de los extractos, a intervalo de 10 días entre inyecciones y a dosis de 1.6 y 3.0 g de trébol seco por kg de peso corporal

Evolución del ciclo estral

Se estudió mediante citología, observando diariamente el tipo de células presentes en el frotis vaginal de cada ratona. El frotis se obtuvo antes de las 8:00 a.m. introduciendo y succionando una gota de solución fisiológica estéril en la vagina, con ayuda de un gotero capilar. El material obtenido se extendió sobre un portaobjetos, se coloreó con solución azul de toluidina al 0.05% y se observó al microscopio

Los animales tuvieron un periodo de adaptación de 15 días. Durante los siguientes 15 días se estableció la evolución normal del ciclo y luego se inició

la administración de los extractos, continuando con las observaciones citológicas, para detectar las alteraciones que sobre el ciclo causaran los extractos. Posteriormente se introdujeron machos, uno por caja de cinco hembras, y se constató la cópula por presencia del tapón vaginal o espermatozoides en el frotis

Análisis estadístico

Los datos mensuales de precipitación pluvial, temperatura ambiente y brillo solar, fueron correlacionados con los valores de actividad estrogénica encontrados.

Los valores de actividad estrogénica en los tréboles pastoreados y no pastoreados, fermentados y no fermentados, fueron comparados por análisis de varianza (10).

Los parámetros reproductivos de las ratonas, fueron comparados entre tratamientos mediante pruebas de T.

Resultados y discusión

Fluctuaciones anuales

Los promedios mensuales de las tres variables meteorológicas, se representan en la Figura 1. Solamente la precipitación pluvial mostró una marcada fluctuación durante el año, presentándose dos períodos lluviosos; el primero, alcanzó su máximo valor en el mes de mayo, y el segundo entre los meses de octubre y noviembre.

La Figura 2, indica las fluctuaciones en la actividad estrogénica de las praderas pastoreadas y no pastoreadas. Se observa un incremento a partir del

mes de agosto en ambas praderas, lo cual coincide con el segundo período de lluvias

Esta relación se observa en forma más clara para la actividad estrogénica de los tréboles fermentados (Figura 3), donde los niveles de ambas praderas fluctúan en forma similar a las variaciones de la precipitación pluvial. El mayor aumento en estrogénicidad ocurrido durante y a continuación del segundo período lluvioso, tal vez fue consecuencia de la alta humedad que permaneció en el suelo, una vez que cesaron las lluvias (enero y febrero) y el concomitante aumento en el brillo solar, condiciones propicias a un acelerado crecimiento y metabolismo vegetal

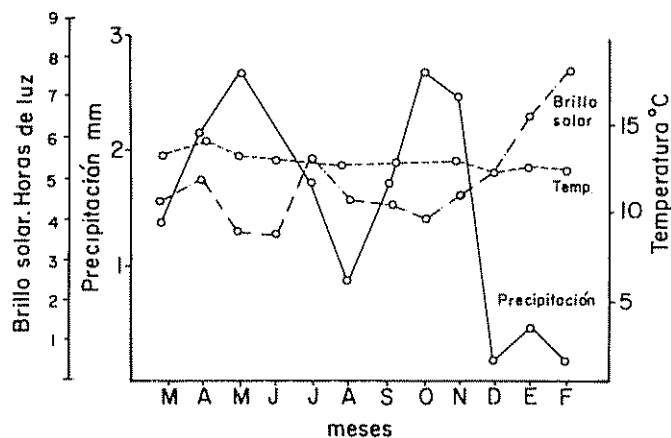


Fig. 1. Promedios mensuales de precipitación pluvial, temperatura y brillo solar.

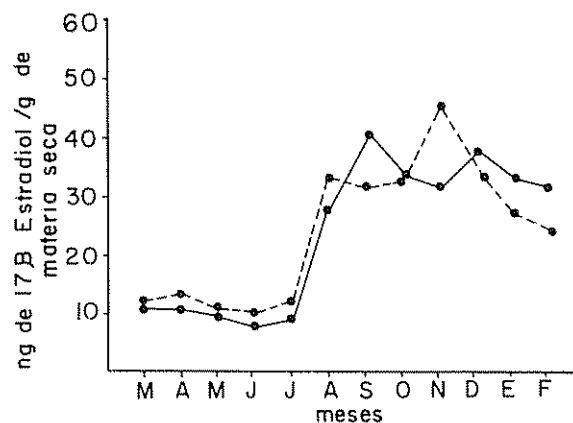


Fig. 2. Promedios mensuales de actividad estrogénica en las praderas pastoreada (---) y no pastoreada (—), sin fermentar

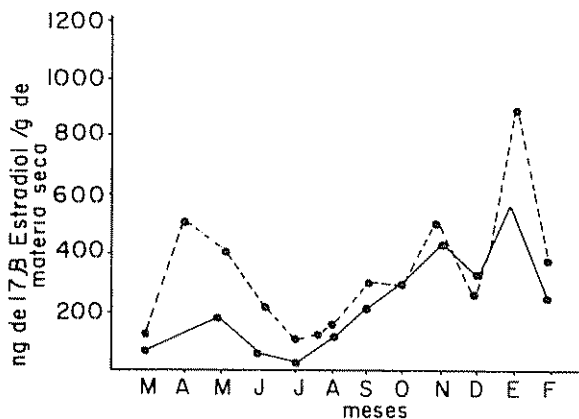


Fig. 3. Promedios mensuales de actividad estrogénica en tréboles fermentados de las praderas pastoreada (---) y no pastoreada (—)

Diferencias entre praderas pastoreada y no pastoreada

Los valores representados en la Figura 2, no difieren significativamente ($P > 0.05$) entre los tréboles sin fermentar de las praderas pastoreada y no pastoreada. Por el contrario, los niveles de estrógenos de las dos praderas después de la fermentación (Figura 3), difieren significativamente ($P < 0.01$).

Efecto de la fermentación ruminal sobre la actividad estrogénica

En promedio, el incremento en actividad estrogénica causada por acción de los microorganismos ruminales (fermentación), fue hasta de 15 veces para la pradera pastoreada y de 8.7 para la no pastoreada.

El valor promedio anual para la pradera no pastoreada, sin fermentar, fue de 22.5 ng de 17β -estradiol/g de materia seca (E/g MS) \pm DS = 13.9, mientras que para las muestras fermentadas fue de 195.6 ng E/g MS \pm DS = 177.8. Para la pradera pastoreada, sin fermentar, el promedio fue de 22.5 ng E/g MS \pm DS = 13.9 y para los fermentados 341.3 ng E/g MS.

Según los trabajos de Rossiter y Beck (24), la genisteína, formononetina y biochanina A, decrecen a medida que avanza la edad de la planta, en contraste con la daidzeína, cuya presencia sólo ocurre en hojas próximas a la senectud.

Puesto que las plantas no pastoreadas son generalmente viejas, y las pastoreadas están en continua recuperación, estas últimas contendrían mayores cantidades de formononetina, genisteína y biochanina A. Sin embargo, en términos de actividad biológica, la formononetina y biochanina A, tienen solamente una veinteava parte de la actividad correspondiente a la daidzeína (28); esto permitiría explicar por qué la actividad biológica de las dos praderas no difirió antes de la fermentación. Es también sabido que la fermentación por microorganismos ruminales desmetila a la biochanina A y a la formononetina para convertirlas en genisteína y daidzeína, sustancias de mayor actividad estrogénica (28). Este hecho explicaría por qué la fermentación incrementó la actividad, y por qué este incremento fue más marcado para las plantas jóvenes (pastoreadas), ricas en biochanina A y formononetina.

Se desconoce cómo fluctúa la cantidad de cumestrol con la edad u otros factores que afecten el metabolismo vegetal; sin embargo Bickoff *et al.* (6), han demostrado que el cumestrol posee una actividad estrogénica superior a la de las isoflavonas y es abundante en el trébol blanco.

Efectos sobre el ciclo y la reproducción del ratón hembra

Vía oral. Las dosis suministradas en los extractos bebidos, fueron para cada experimento de 16.6 y de 18.2 g de trébol seco por kg de ratón (g/kg) para el extracto digerido y de 12.9 y 18.9 g/kg para el no digerido. Estas dosis alteraron la ciclicidad, pero no causaron disturbios colaterales visibles sobre el ratón.

La Figura 4, muestra las alteraciones típicas del ciclo estral, inducidas por la administración oral diaria de los extractos durante 25 días. Se presentan los ciclos estrales de un animal representativo de cada tratamiento y uno del grupo testigo.

A partir de la iniciación del tratamiento con los extractos, se observa un alargamiento de los períodos de estro y diestro. Las leves alteraciones que se observan en el grupo control, se deben quizá a que fue necesario hacer un cambio en el régimen alimenticio. Mientras los testigos copularon en su primer estro después de la introducción del macho, las ratonas tratadas con los extractos no fueron receptivas hasta un lapso 1.6 veces más largo (digerido) y 1.3 (no digerido), a pesar de sus prolongados estros (Cuadro 1). Este efecto continuó aún después de la suspensión del tratamiento para algunas ratonas que no aceptaron al macho.

Para los dos tratamientos con trébol, el promedio en días por animal, en diestro más estro desde el primer día en tratamiento hasta la cópula, fue de 13.7 días para el digerido y de 13.0 para el no digerido (Cuadro 1), y fueron significativamente ($P < 0.05$) mayores que para el testigo (10.1). La diferencia entre tratamientos no fue significativa ($P > 0.05$).

La administración del extracto digerido causó alteraciones del ciclo estral en el 84% de las hembras, el extracto no digerido en el 85%, mientras que en el grupo control sólo el 35.5% mostraron alteraciones.

El promedio de días para copular fue de 9.8 y 8.1 para los tratamientos y 6.1 para el control. Para los animales que no habían copulado al retirar el macho, se contaron el total de días que permanecieron en presencia del macho.

El tratamiento con el extracto digerido disminuyó la receptividad en un 30% y el no digerido en un 10%.

Como se observa en el Cuadro 1, solamente el 70% de las ratonas testigo gestaron, sin que exista explicación para esta baja reproducción. El número de crías por grupo, incluyendo las hembras que no

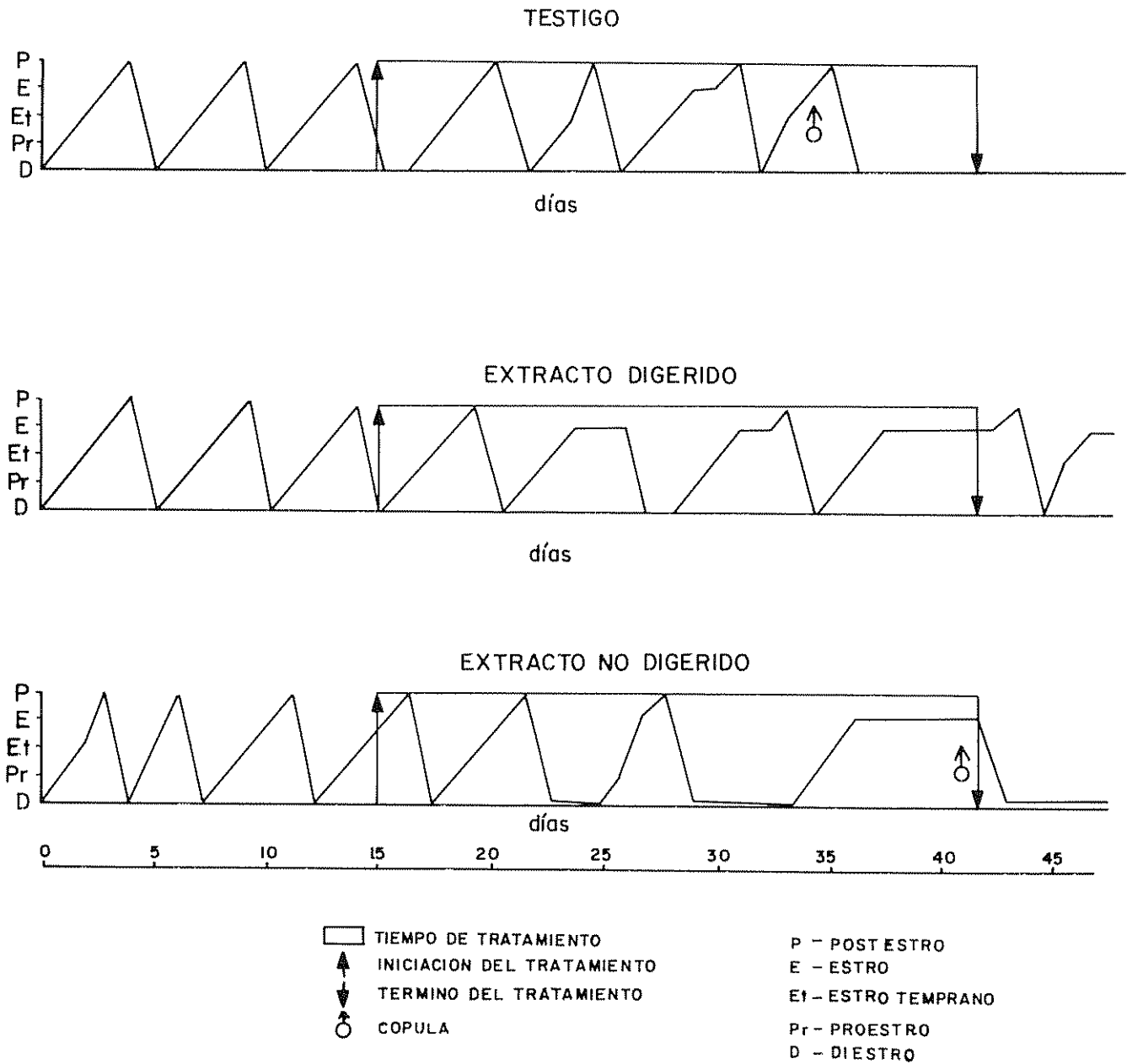


Fig. 4. Alteraciones típicas del ciclo estral causadas por la administración de dosis diarias por vía oral de extracto de *Trifolium repens* durante 25 días.

gestaron, muestra una reducción cercana a la mitad en el caso del tratamiento con el extracto digerido, en relación al testigo (Cuadro 1). No computando las ratonas vacías, se produjeron entre dos y tres crías menos que el testigo; no obstante, estas diferencias no fueron significativas ($P > 0.05$)

Vía intraperitoneal: Las tres dosis ensayadas intraperitonealmente para ambos extractos (0.4, 1.6 y 3.0 g/kg) fueron efectivas y no causaron intolerancia o toxicidad.

La Figura 5, muestra la evolución de los ciclos de un animal testigo y uno de cada tratamiento, e indica que los animales inyectados intraperitonealmente en diestro, presentan el mismo efecto que oralmente. Cuando se inyectan en otras fases, en general el efecto se retrasa hasta el siguiente ciclo. La segunda inyección no intensificó el efecto de la primera, supuestamente porque sus efectos aún persistían.

El promedio de días que las hembras tratadas permanecieron en diestro y en estró, fue mayor que para

Cuadro 1. Alteraciones en el ciclo estral, la receptividad y la fertilidad causadas por la administración oral de dosis diarias, durante 25 días de *Trifolium repens*

Parámetros	Extractos de trébol		
	Testigo	Digerido	No digerido
Dosis g/kg/día ^{1/}	0.0	17.7	18.2
Número de animales en dos experimentos	20	20	20
Días en diestro + estro ^{2/3/}	10.1 ^a	13.7 ^b	13.0 ^b
Ratonas afectadas (%)	35.5	84.0	85.0
Días para copular o en experimento ^{4/5/}	6.1	9.8	8.1
Receptividad % ^{5/6/}	100	70	90
Preñez % ^{5/}	70	50	80
Promedio crías/ratona (incluyendo las que no gestaron) ^{5/}	6.4	3.4	5.6
Promedio crías/ratona (incluyendo las que no gestaron) ^{5/}	9.1	6.8	7.0

- 1 Gramos de material vegetal seco por kilogramo de peso corporal.
- 2 Diferencia (a ≠ b) estadísticamente significativa (P < 0.05). Prueba de T.
- 3 Promedio por animal, desde el primer día en tratamiento hasta la cópula, o fin del experimento.
- 4 Promedio por animal, desde la introducción del macho.
- 5 Calculado sobre 10 animales por tratamiento en un sólo experimento.
- 6 Porcentaje de ratonas que copularon.

el control. Mientras que en los tratamientos el 88% y el 82.5% de los animales se vieron afectados en su ciclo, sólo el 27.5% del control presentaron alteraciones (Cuadro 2).

No hubo diferencia (P > 0.05) entre los animales tratados y los testigos en cuanto al índice de preñez, pero el número de crías por ratona disminuyó, aunque no significativamente para los animales en tratamiento (Cuadro 2).

Los valores de la actividad estrogénica medidos *in vitro*, fueron 15 veces mayores para el extracto digerido; esta diferencia no fue significativa *in vivo*, aunque los animales que recibieron el extracto digerido por vía oral en forma continua, se vieron más afectados que los que recibieron el extracto no digerido, en cuanto a receptividad, preñez y número de crías por madre.

La discrepancia de los resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo* puede deberse a que las dosis utilizadas fueron de saturación para ambos extractos, como se corroboró al observar que las dosis intraperitoneales de 1.6 y 3.0 g/kg no difirieron en su respuesta y tuvieron efecto similar a las dosis orales que fueron entre 60 y 120 veces superiores para todo el periodo experimental.

Otra posible explicación a la discrepancia entre los resultados *in vivo* es la de que los métodos miden diferentes respuestas; *in vitro* se mide la afinidad de los fitoestrógenos por receptores uterinos aislados, mientras que *in vivo* se mide el efecto sobre todo el organismo, lo cual incluye no sólo la afinidad por receptores del útero, sino por receptores de la hipófisis, hipotálamo y demás órganos, y la permanencia de la unión entre receptor y estrógeno, o "avidez", la cual es prolongada, juzgando por el efecto durable que tiene una dosis única. Los informes de Underwood y Shier (1951), demostraron que ovejas después de pastorear forrajes estrogénicos, seguían infértiles varios años. Además, ésta "avidez" puede ser igual para ambos extractos, causando efectos similares para el digerido y el no digerido.

El método aquí utilizado mide, *in vitro*, la actividad estrogénica del trébol en términos de ng de E. Con base a estos resultados, podría calcularse que una vaca que consuma 5 kg de trébol seco con 200 ng de E/g, ha consumido estrógenos en cantidad equivalente a un millón de ng de estradiol, los cuales diluidos en 50 l de sangre, causarían una concentración de 20 ng/ml. Esta cifra sería mil veces superior a la concentración de Estradiol circulante durante el proestro en la vaca (20 pg/ml). Tal concentración sería suficiente para causar disturbios reproductivos, a

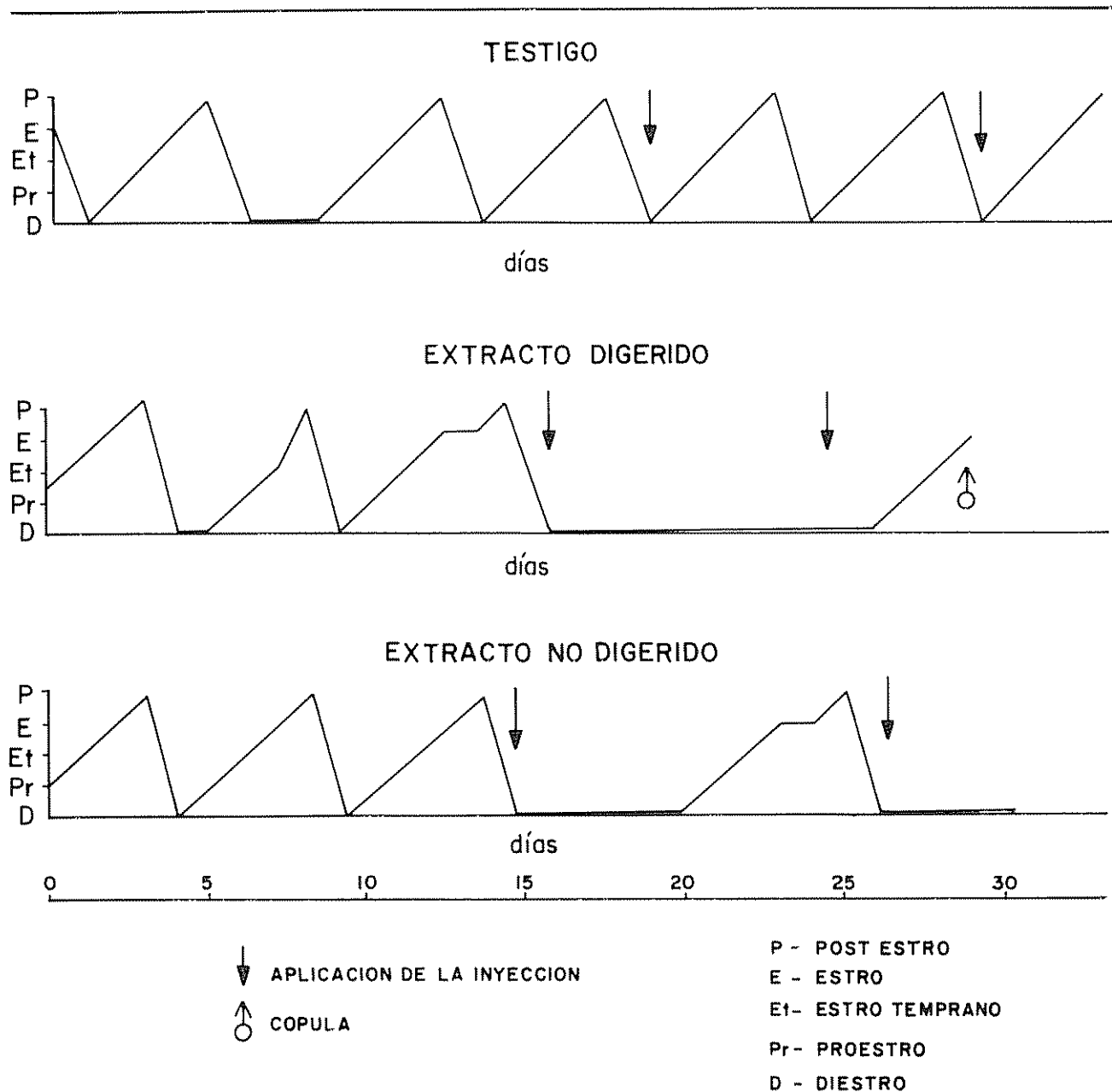


Fig 5 Alteraciones típicas del ciclo estral causadas por la administración de dos inyecciones intraperitoneales de extracto de *Trifolium repens* (Dosis: 1.6 g/kg)

menos que como comenta Shutt (27), las isoflavonas sean inactivadas en el rumen del animal, no sean absorbidas en forma de conjugados de muy baja actividad, lo cual puede ser contrario a lo reportado por numerosos estudios en ovejas

Una explicación más adecuada puede basarse en el hecho de que la equivalencia en Estradiol que arroja el análisis por competencia, no corresponda a la misma equivalencia *in vivo* como aquí se informa.

De todas maneras, este estudio pone en evidencia la necesidad de estudiar el efecto de los fitoestrógenos sobre la fertilidad del bovino

Del presente trabajo se deduce:

1. El trébol blanco, conocido anteriormente como dudosamente estrogénico, presentó una elevada actividad, en condiciones o suelos del trópico alto frío

Cuadro 2. Alteraciones en el ciclo estral, la receptividad y la fertilidad causadas por la administración de dos inyecciones I. P. de extracto de *Trifolium repens* con 10 días de intervalo.

Parámetros	Extractos de trébol		
	Control	Digerido	No digerido
Dosis g/kg/día	0.0	3.0 y 1.6 ¹	3.0 y 1.6 ¹
Número de animales en dos experimentos	18	17	17
Días en diestro + estro ^{2/3/}	6.7 ^a	10.2 ^b	10.0 ^b
Ratonas afectadas %	27.5	88.0	82.5
Días para copular en experimento ^{4/5/}	5.4	6.5	5.5
Receptividad % ^{5/6/}	100	87	89
Preñez (%) ^{5/6/}	90	87	78
Promedio de crias/ratona (incluyendo las que no gestaron) ^{5/6/}	5.9	4.8	4.1
Promedio crias/ratona (excluyendo las que no gestaron) ^{5/6/}	6.5	5.5	5.3

1 Gramos de material vegetal seco por kilogramo de peso corporal 3.0 g en el primer experimento y 1.6 g en el segundo.

2, 3, 4, 5 y 6 Ibid Cuadro 1

- La actividad estrogénica se incrementa al aumentar la humedad del suelo y el brillo solar, condiciones que estimulan el crecimiento de la planta
- El metabolismo microbial del rumen, aumentó la actividad estrogénica de los tréboles medidos *in vitro*, pero este efecto no fue detectable en ratonas bajo las condiciones experimentales usadas

Resumen

No hay claridad sobre la estrogénicidad del trébol blanco, ni sus efectos sobre la fertilidad animal. Siendo éste una importante fuente proteica para la ganadería de América Latina, se midió mediante un método de competencia radio-receptor la actividad estrogénica durante un ciclo anual. La estrogénicidad aumentó con las lluvias, el brillo solar y la fermentación ruminal, pero no fue afectada por la temperatura ambiente ni el pastoreo.

Con el fin de dilucidar si la estrogénicidad medida *in vitro* influye sobre la fertilidad de un animal, se midieron algunos parámetros reproductivos del ratón hembra, sometida a beber extractos acuosos del trébol, o a dos inyecciones de los mismos. Los ciclos estrales se vieron drásticamente alargados en sus estros y diestros y la fertilidad deprimida. Estos efectos fueron similares para las dosis inyectadas y las orales, aunque estas últimas acumuladas constituyeron cantidades cien veces mayores que las inyectadas. El suministro oral del extracto fermentado parece haber deprimido la fertilidad más que el no fermentado, pero no difirieron en su acción por vía parenteral.

Literatura citada

- ALEXANDER, G., y WATSON, R. H. The assay of oestrogenic activity of *Trifolium subterraneum* L. by increase in uterine weight in spayed guinea pig. II. Assay. Journal of Agricultural Research 2:480 1951
- BECK, A. B. The oestrogenic isoflavones of subterranean clover. Australian Journal of Agricultural Research 15:223. 1964.
- BENNETT, D., MORLEY, F. H. W., y AVELSEN, A. Bioassay responses of ewes to legume swards II. Uterine weight results from swards. Australian Journal of Agricultural Research 18:495. 1967.
- BENNETTS, H. W. Metaplasia in the sex organs of castrated male sheep maintained on early subterranean clover pastures. Australian Veterinary Journal 22:70. 1946.
- BENNETTS, H. W., UNDERWOOD, E. J., y SHIER, F. L. A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. Australian Veterinary Journal 22:2. 1946.
- BICKOFF, E. M., BOOTH, A. N., LYMAN, R. L., LIVINGSTON, A. L., THOMSON, C. R., y DEEDS, F. Coumestrol a new estrogen isolated from forage crops. Science 126:969. 1957.

7. BICKOFF, E. M., BOOTH, A. N., LIVINGSTON, A. L., y HENDRICKSON, A. P. Observations on the effect of drying on oestrogenic activity of alfalfa samples of varying maturity. *Journal of Animal Science* 19:189. 1960.
8. BICKOFF, E. M., LIVINGSTON, A. L., BOOTH, A. N., THOMSON, C. R., HOLLOWELL, E. A. y BEINHART, E. G. Some variation in oestrogenic activity in fresh and dried white clover and the ladino variety. *Journal of Animal Science* 19:143. 1960b.
9. CORKER, C. S., EXLEY, D., y NAFTOLIN, F. Assay of 17- β -oestradiol by competitive protein binding methods. *Acta Endocrinológica*, 1970 Suppl 147:305 p.
10. CROW, E. L., DAVIES, F. A., y MAXFIELD, M. W. *Statistics Manual*. Dover Publications, Inc. New York. 1960.
11. CHENG, E., STORY, C. D., PAYNE, L. C., YODER, L., y BURROUGHS, W. Detection of estrogenic substances in alfalfa and clover hays fed to fattening lambs. *Journal of Animal Science* 12:507. 1953.
12. FRANCIS, C. H. y MILLINGTON, A. I. Varietal variation in the isoflavone content of subterranean clover: Its estimation by a micro-technique. *Australian Journal of Agricultural Research* 16:557. 1965.
13. GUGGOLZ, J., LIVINGSTON, A. L., y BICKOFF, E. M. Detection of daidzein, formononetin, genistein and biochanin A in forages. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 9:30. 1961.
14. KITTS, W. D., SWIERSTRA, E., BRINK, V. C. y WOOD, A. I. The estrogenlike substances in certain legumes and grasses. I. The quantitative determination of such substances in red clover and oats. *Canadian Journal of Animal Science* 39:396. 1959.
15. KORENMAN, S. G., PERRIN, L., y McCALLUM, T. P. A radioligand binding assay system for estradiol measurement in human plasma. *Journal Clinical Endocrinology* 29:879. 1969.
16. LINDNER, H. R. Study of the fate of phyto-oestrogens in the sheep by determination of isoflavones and coumestrol in the plasma and adipose tissue. *Australian Journal of Agricultural Research* 18:305. 1967.
17. MOULE, G. R., BRADEN, A. W. H., y LAMOND, D. R. The significance of oestrogens in pasture plants in relation to animal production. *Animal Breeding Abstracts* 31(2):139. 1967.
18. NEWTON, J. E. y BETTS, J. E. Seasonal oestrogenic activity of various legumes. *Journal of Agricultural Sciences* 70:77. 1968.
19. NILSSON, A. Demethylation of the plant oestrogen biochanin A in the rat. *Nature, London* 192:358. 1961.
20. NILSSON, A. Demethylation of the plant oestrogen formononetin to daidzein in rumen fluid. *Arkiv for Kemi* 19:549. 1962.
21. PIETERSE, P. J. S., y ANDREWS, F. N. The estrogenic activity of alfalfa and other feedstuffs. *Journal of Animal Science* 15:25. 1956.
22. ROSSITER, R. C., y BECK, A. B. Physiological and ecological studies on the oestrogenic isoflavones in subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.) I. Effects of temperature. *Australian Journal of Agricultural Research* 17:29. 1966.
23. ROSSITER, R. C., y BECK, A. B. Physiological and ecological studies on the oestrogenic isoflavones in subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.) III. Effects of light. *Australian Journal of Agricultural Research* 18:23. 1967a.
24. ROSSITER, R. C., y BECK, A. B. Physiological and ecological studies on the oestrogenic isoflavones in subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.) V. Ontogenetic Changes. *Australian Journal of Agricultural Research* 18:561. 1967b.
25. ROSSITER, R. C. Factors affecting the oestrogenic content of subterranean clover pastures. *Australian Veterinary Journal* 46:141. 1970.

26. SANGER, V. L., ENGLE, P. H., y BELL, O. S. Evidence of estrogenic stimulation in anestrous ewes pastured on ladino clover and birdsfoot trefoil, as revealed by vaginal smears. *American Journal of Veterinary Research* 19:288. 1958.
27. SHUTT, D. A. Los efectos de los estrógenos vegetales sobre la reproducción animal. *Endeavour* 35:126. 1976.
28. SHUTT, A. R., y COX, R. I. Steroid and phyto-oestrogen binding to sheep uterine receptors *In vitro*. *Journal of Endocrinology* 52:209. 1972.
29. TILLEY, J. H., y TERRY, R. A. A two stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *Journal of the British Grassland Society* 18:104. 1963.
30. WONG, E. Detection and estimation of oestrogenic constituents in red clover. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 13:304. 1962.

Notas y comentarios

La corriente del Niño y el maíz

Los rendimientos del maíz en los Estados Unidos están correlacionados con la temperatura de la superficie del Océano Pacífico. La perturbación climática de 1983 ha sido achacada a la corriente de El Niño, que ese año bajó por la costa Norte del Perú con tal inusitada fuerza que sus efectos han sobrepasado los límites normales y ha roto los records históricos de este fenómeno. Hay algunos que achacan a El Niño mismo el causar ese año la erupción del volcán mejicano El Chichón; otros especulan que las cenizas de este volcán fueron las que, al subir hasta partes muy altas de la atmósfera, provocaron cambios que intensificaron la fuerza de la corriente. En los años venideros, se van a estudiar las implicaciones y efectos de esta peculiar corriente marina.

Por lo pronto, Paul y Ellen Handler, de la Universidad de Illinois, han encontrado que en los años en que El Niño ha hecho que la temperatura de la superficie del Pacífico tropical sea más alta que lo normal, hay una probabilidad más alta de que la cosecha de maíz en los Estados Unidos aumente.

En su estudio (*Science*, vol. 220, p. 1155), usan datos de producción de maíz que van desde 1869 hasta 1979, periodo en que El Niño se presentó en 49 de los 112 años. El efecto, que influye en una pequeña proporción del rendimiento del cultivo, es estadísticamente significativo y puede explicarse por un desplazamiento de la corriente de chorro, esa faja de vientos de varios cientos de kilómetros por hora, situada en los confines de la tropósfera (de 10 a 15 kilómetros de altura sobre el nivel del mar), que se mueve en el mismo periodo que El Niño, permitiendo que más lluvia llegue a las zonas productoras del grano. Sin embargo, no se sabe todavía con certeza si El Niño causa el desplazamiento de la corriente de chorro, o si el cambio en la circulación atmosférica afecta la temperatura del océano. Adalberto Gorbitz

AXILLARY BUD DEVELOPMENT FROM NODAL CULTURES OF BEAN SEEDLINGS (*Phaseolus vulgaris* L.)¹

I. S. MARTINS*
M. R. SONDAHL*

Resumo

As condições ótimas para a indução de desenvolvimento e crescimento de gemas axilares de plantulas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) consistem na germinação em presença de 6-BA (20 μ M) e cultura da região nodal em meio básico B5 com adição de 6-BA (5 μ M) e IBA (0.25 μ M). O enraizamento das plantulas derivadas das gemas axilares foi obtido na presença de IBA (10 μ M) durante 10 dias, seguido de cultura em meio básico B5. A presença de luz foi essencial para o desenvolvimento de gemas axilares a partir de explantes da região nodal de feijão. A frequência de indução de gemas axilares e o crescimento das plântulas derivadas destas gemas apresentaram diferenças de acordo com a posição do nó e o genótipo. O cultivar Puebla-153 apresentou maior frequência de indução de gemas axilares, enquanto que no cultivar Carioca observou-se melhor crescimento das plântulas induzidas. O número máximo de gemas desenvolvidas por axila foliar foi seis (6) para o cultivar Moruna (no I), sugerindo que 12 seria o total de gemas dormentes para cada nó cotiledonar de plântulas de feijão.

Introduction

The maintenance of bean germplasm requires suitable installations and periodic sowing in order to assure seed viability. Plant tissue culture techniques may help germplasm banks of this species through continuous *in vitro* bud culture or storage in liquid nitrogen. Aseptic cultures of buds also allow for exchange of genetic material between countries or distinct regions without the risk of introducing new phytopathogens. Plants derived from bud cultures are genetically uniform since they are generated by a vegetative process

The possibility of maintaining genotypes of *Lotus corniculatus* by nodal cultures was demonstrated by Tomes (5). Among 100 genotypes studied, 34% were lost during the 1977-1978 winter due to field

conditions. However, all of these genotypes were available from *in vitro* cultures kept at low temperatures during the same period. The time required to raise an adult plant from *in vitro* culture was the same as from germinating seeds. In soybean, Cheng *et al.* (1), (4) and Saka *et al.* (4) showed that the development of axillary buds from nodal cultures was induced by different treatments with 6-benzyl-aminopurine (6-BA) and indole-3-butyric acid (IBA) in the culture medium. This paper presents a methodology for the development of axillary buds from nodal cultures and plant recovery in beans (*Phaseolus vulgaris* L.)

Materials and methods

Seeds from the bean germplasm bank maintained at the Genetic Department of the Institute of Agronomy were utilized for this study. Following washing with detergent (Neo dish 1%) and tap water, the seeds were surface sterilized with ethanol 96° GL for 10 min., and then in NaOCl 4% for 20 min. Glassware and culture media were all sterilized by autoclave (120°C, 20 min.). All the culture bottles were sealed with a PVC film (16.5 μ M thickness).

¹ Received for publication on December 23, 1983.
Supported by FAPESP and CNPq.

* Dept. Genetics, Institute of Agronomy, P. O. Box 28, Campinas, SP, Brazil. Present address of MR Sondahl: DNAP, 2611 Branch Pike, Cinnaminson, NJ 08077, USA.

Different cultivars and culture conditions were tested for the induction of the development of axillary buds from nodal cultures of bean seedlings (*Phaseolus vulgaris* L.)

Seeds of the cultivars Moruna, Piratã-1 and Puebla-153 were germinated in an aqueous solution containing 6-BA (5 or 10 μM). Half of the replicates were kept under a 12 h photoperiod and the other half was cultivated in the dark during an initial period of 9 days. After 12-15 days of germination, evaluations were made pertaining to the number and height of axillary buds developed in the nodal regions of the bean seedlings. The nodal region containing the cotyledonary leaves was coded "node-I", whereas "node-II" comprises the region of the primary leaves. In this first experiment 30 replicates/cultivar/6-BA concentration/culture conditions were performed.

During a second experiment, seeds of the cultivars Moruna and Carioca were germinated in bottles containing the following basic medium: B5 inorganic salts (12); thiamine (30 μM); pyridoxine (5 μM); nicotinic acid (10 μM); meso-inositol (550 μM); sucrose (20 g/l); agar (6 g/l); pH 5.8. To the above basic medium were added 6-BA (50 μM) and IBA (0.025 μM). After 19 days of germination, all axillary buds developed in the nodal regions (nodes I and II) were removed and coded B1. The original nodal explants were transferred to the basic B5 medium supplemented with 6-BA (20 μM) and IBA (0.025 μM). After a period of 17 days of secondary culture, all the axillary buds developed (B2) were removed. The original explants were transferred to the basic B5 medium without growth regulators. The buds developed after 25 days in this tertiary culture were coded B3. These successive cultures were adopted in order to avoid possible growth inhibition of new axillary buds due to the presence of developed buds in the same node. Twenty replicates for each cultivar studied were prepared.

In a third experiment, seeds of the cultivar Puebla-153 were germinated in the basic medium supplemented with 6-BA (20 μM) and IBA (0.025 μM). Following 16 days of culture, nodes I and II were excised and cultivated in the basic medium supplemented with 6-BA (20 μM) and IBA (0.025 μM) or 6-BA (5 μM) and IBA (0.025 μM). Thirty replicates were prepared for each treatment.

Seed germination and nodal cultures for experiments 2 and 3 were performed under a 12 h photoperiod, 400-800 lux and temperature of $26 \pm 3^\circ\text{C}$. During the evaluation of the experiment the number and height of axillary buds developed were recorded.

Results and discussion

Experiment 1

The techniques described for nodal cultures of soybean (*Glycine max*) by Cheng *et al.* (1) and Saka *et al.* (4) were tested with *P. vulgaris*. Seeds of the cultivars Moruna, Piratã-1 and Puebla-153 were germinated in an aqueous solution of 6-BA (5 or 10 μM) in the dark or under a 12 h photoperiod. After 9 days it was observed that all treatments in the presence of light carried axillary buds (1-2 mm) in the nodal regions. On the other hand, the cultures maintained in the dark did not have any sign of bud development. Taking into account the beneficial effect of the light on the axillary bud development, all the remaining cultures were transferred from dark to light. After 12-15 days of culture, the treatments were evaluated (Table 1). In the presence of 6-BA (5 μM) the number of buds developed at node I and node II was one half in the cultures kept for 9 days in the dark in comparison to the ones under 12 h photoperiod. The cultures exposed to 6-BA (10 μM) presented the same frequency of bud development in both conditions (light and dark-light). These data demonstrated the interaction of 6-BA and light in the development of axillary buds from nodal regions of beans. The frequency of bud development varied according to the genotype in relation to node-II in the presence of 6-BA (10 μM). Twice as many axillary buds were observed in the cultivar Puebla-153 than in Moruna in both conditions (light and dark-light). Bean seedlings initiated in the dark (9 days) and transferred to light presented an average of 1.8 and 0.9 axillary buds/node-II for Puebla-153 and Moruna, respectively. Cultures grown in the light gave values of 2.0 and 1.0 axillary buds/node-II for Puebla-153 and Moruna, respectively. It was also observed that Puebla buds were more developed (5-7 mm height) than buds of the two other cultivars (3-4 mm height) after the same period of culture.

Experiment 2

This experiment was designed to determine the maximum number of axillary buds inducible by this method in nodal regions of bean seedlings (Table 2). The total number of developed axillary buds in node-I was 5.0 and 4.3 for Moruna and Carioca, respectively. The values for node-II were 4.5 (Moruna) and 4.8 (Carioca). The maximum number of axillary buds observed was six in one axil of the node-I of Moruna, suggesting that the total expected number for this node-I for *P. vulgaris* is twelve, i. e. six for each cotyledonary axil.

Table 1. Development of axillary buds from cotyledonary node (node I) and primary leaf node (node II) excised from seedlings of *Phaseolus vulgaris*.

Cultivar	Culture Condition (a)	6-BA (μM)	Period of Culture (days)	No. buds/node I		No. buds/node II	
				Total	Average	Total	Average
Moruna	dark/light	5	15	15/24	0.6	10/24	0.4
Moruna	dark/light	10	15	34/25	1.4	23/25	0.9
Moruna	light	5	12	31/26	1.2	23/26	0.9
Moruna	light	10	12	29/22	1.3	23/22	1.0
Piratã-1	dark/light	5	15	10/16	0.6	7/16	0.4
Piratã-1	light	5	15	12/12	1.0	16/12	1.3
Puebla-153	dark/light	10	15	38/26	1.5	46/26	1.8
Puebla-153	light	10	12	30/24	1.25	48/24	2.0

a Germination in 6-BA solution during 9 days in the dark followed by 12 h photoperiod, or germination directly under 12 h photoperiod.

Table 2. Sequential axillary bud development from cotyledonary node (node I) and primary leaf node (node II) from seedlings of *Phaseolus vulgaris*.

Cultivar	Nodal region	Axillary buds (a)	Replicates (no.)	Bud induction per culture (%)	Frequency bud development (no.)	Average shoot height (mm)
Moruna	I	B1	20	100	1.7	3.2
Moruna	I	B2	20	10	1.0	6.5
Moruna	I	B3	16	69	2.3	7.6
					5.0	
Moruna	II	B1	20	100	1.4	2.5
Moruna	II	B2	20	50	1.4	9.5
Moruna	II	B3	15	93	1.7	9.9
					4.5	
Carioca	I	B1	16	75	1.5	2.8
Carioca	I	B2	15	60	1.3	13.4
Carioca	I	B3	11	73	1.5	14.7
					4.3	
Carioca	II	B1	16	94	1.9	3.6
Carioca	II	B2	15	67	1.6	10.6
Carioca	II	B3	11	54	1.3	8.9
					4.8	

a B1: buds excised after 19 days of culture in the presence of 6-BA (50 μM) and IBA (0.025 μM). B2: buds excised after 19 days of primary culture followed by 17 days in the presence of 6-BA (20 μM) and IBA (0.025 μM). B3: buds excised after 19 days of primary culture, 17 days of secondary culture and 25 days in the basic medium.

A genotypic difference was observed once again pertaining to the height of shoots derived from node-I. The average height (mm) of Moruna shoots was 3.2 (B1), 6.5 (B2) and 7.6 (B3) whereas for Carioca shoots, values of 2.8 (B1), 13.4 (B2) and 14.7 (B3) were observed. Note that differences appeared during second and third culture.

The results regarding the cultures of hypocotyl and epicotyl segments of the common bean suggest that *P. vulgaris* does not have meristematic regions along the hypocotyl and epicotyl axis. Therefore, dormant buds are only found at the nodal regions. Kameya and Widholm (3) demonstrated development of buds from hypocotyl explants of *Glycine*

canescens and discussed the possibility of such buds being derived from pre-existing meristematic centers along the hypocotyl axis. This hypothesis was based on the fact that higher frequencies of buds were found on hypocotyl segments close to the cotyledonary node. In the same paper they indicated that buds could not be observed from the culture of hypocotyl segments without nodal regions in *G. max*. This suggests that, as in common beans, dormant buds in soybean are only present in the nodal regions.

Experiment 3

The effect of 6-BA on the development of axillary buds from bean seedlings described in experiments 1 and 2 was further studied by using different 6-BA concentrations during primary culture of nodal regions of the cultivar Puebla-153. Nodal explants cultivated with 6-BA (20 μM) developed innumerable small buds (1-2 mm) with a frequency of 30-50 buds/node. This number represents the total number of buds including primary, secondary, and tertiary buds. Primary buds were designated as the ones developed from the nodal explant, and secondary buds as those derived from the nodes of the primary shoots, and so on. On the other hand, nodal segments cultivated in the presence of 6-BA (5 μM) presented excellent bud development (Figure 1). Among 28 cotyledonary nodes (node I), 27 nodes (96%) developed axillary buds with an average frequency of 4.2 buds/node and 9.1 mm of average height after 33 days of culture. During the culture of 25 primary leaf nodes (node II), 100% bud development was observed, with an average of 4.8 buds/node and 8.2 mm of average height following 33 days of culture. These data suggest that the best sequence for the development of axillary buds from nodal regions



Fig 1 Axillary bud development from cotyledonary nodes of bean seedlings (*Phaseolus vulgaris* cv Puebla - 153), following 18 days of culture.

I and II of bean would be: (a) germination in the presence of high levels of 6-BA (20 μM); and (b) subsequent development of induced buds in the presence of low levels of 6-BA (5 μM). Similar observations were made in soybean cultures by Cheng *et al.* (1). The development of axillary buds was stimulated by the subculture of soybean nodal explants from high levels of 6-BA (10-50 μM) to low levels of 6-BA (1 μM). During the experiment 2, axillary buds were developed from nodal cultures in the presence of 6-BA (20 μM), without secondary or tertiary buds. Perhaps the excision of the developed buds at each subculture would facilitate the induction of new primary buds. A genotypic difference among nodal cultures from bean seedlings may also explain this behavior. This would represent another example of medium specificity for different cultivars. A sequential reduction of 6-BA concentrations from germination to nodal cultures seems very important in order to assure optimum growth of axillary buds.

Rooting of the shoots derived from axillary buds was promoted by culturing in B5 medium, supplemented with IBA (10 μM) for 10 days. Following transfer to B5 medium without growth regulators, a fast growing root system was observed after 20 days.

Summary

The best conditions for the induction of development and growth of axillary buds of bean seedlings (*Phaseolus vulgaris*) consist of germination in the presence of 6-BA (20 μM) and culture of derived nodal regions in the basic B5 medium supplemented with 6-BA (5 μM) and IBA (0.25 μM). Rooting of the shoots derived from axillary buds was induced by IBA (10 μM) for 10 days, followed by culturing the plantlets in the basic B5 medium without growth regulators. The presence of light was essential to the development of axillary buds from nodal explants of bean seedlings. The frequency of axillary bud induction and the shoot growth were different according to the node position and genotype. The cultivar Puebla-153 presented higher induction frequencies, whereas better shoot growth was observed for the cultivar Carioca. The maximum number of buds developed per leaf axil was six (cv. Moruna, node I) suggesting a total of twelve dormant buds at each cotyledonary node of bean seedlings.

Literature cited

1. CHENG, T. Y., SAKA, H., and VOQUI-DINH, T. H. Plant regeneration from soybean cotyledonary node segments in culture. *Plant Science Letters* 19:19-99. 1980.

- 2 GAMBORG, O. L., MILLER, R. A., and OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50:151-158. 1968.
- 3 KAMEYA, T., WIDHOLM, J. Plant regeneration from hypocotyl sections of *Glycine* species. *Plant Science Letters* 21:289-294. 1981.
- 4 SAKA, H., VOQUI-DINIL, T. H., and CHENG, T. Y. Stimulation of multiple shoot formation on soybean stem nodes in culture. *Plant Science Letters* 19:193-201. 1980.
- 5 TOMES, D. T. A tissue culture procedure for propagation and maintenance of *Lotus corniculatus*. *Canadian Journal of Botany* 57:137-140. 1979.

Reseña de libros

JANZEN, D. H. *Costa Rican Natural History*. The University of Chicago Press, Chicago, 1983. 816 p.

Este libro representa el aporte de 174 autores bajo la coordinación del Dr. Daniel H. Janzen, ecólogo tropical de amplia experiencia. Se trata del mejor intento formal, que se haya publicado hasta la fecha, para recopilar el conocimiento acumulado sobre la historia natural de este país.

Costa Rica, a pesar de ser un pequeño país, por su posición geográfica y su relieve, ofrece al científico en ciencias naturales una amplia variedad biológica producto de un fuerte proceso de endemismo. Esto ha hecho de este país mesoamericano un lugar de convergencia de numerosos investigadores internacionales que han contribuido a mejorar el conocimiento de los diversos aspectos biológicos y ecológicos.

Como en todo libro de carácter enciclopédico, no debe el investigador esperar una obra maestra en el capítulo donde se es especialista. Debe, en su lugar, valorarla como una obra global muy valiosa, precisamente en aquellos capítulos donde no se es especialista. Considero que esta obra es muy apropiada, principalmente para aquel naturalista extranjero que se quiera informar de manera muy actualizada, y relativamente profunda, acerca de ese pequeño y ahora famoso país de numerosos parques nacionales, estaciones de campo y reservas biológicas.

Hacer una revisión completa de una obra de esta envergadura es una tarea difícil. Sin embargo, resumiendo groseramente el contenido, tan variado como valioso, podríamos iniciar diciendo que los primeros cinco capítulos ofrecen un bosquejo introductorio acerca del desarrollo histórico de las ciencias naturales en este país. También se incluye dentro de los capítulos introductorios, valiosa información sobre biogeografía de América Central, clima, historia geológica y una lista someramente anotada de los tipos de suelo, que quizá mereció un desarrollo más profundo.

El capítulo seis nos ofrece un interesante análisis de la agricultura de Costa Rica: su historia, tipo de distribución y explotación de la tierra, así como de los principales cultivos. El análisis de la producción agrícola de Costa Rica, visto con ojos extranjeros, lleva al lector costarricense a la meditación. Al final de este capítulo, así como de muchos de los subsiguientes, se incluye una valiosa lista comentada e ilustrada con magníficas fotografías de las principales especies biológicas tratadas.

A partir del séptimo capítulo, el enfoque de la obra se vuelve más biológico y cada apartado del libro posee al inicio una magnífica introducción, donde quizá estén muchos de los principales aportes que ofrece el tratado y encontramos también el análisis individual, o ensayo corto, sobre cada especie considerada importante. El séptimo capítulo sobre las plantas, se inicia con un interesante análisis sobre el sistema de clasificación de zonas de vida de Holdridge y colaboradores y las plantas existentes en Costa Rica. Seguidamente se ofrece una descripción de los principales sitios existentes en este país para el estudio biológico, así como

su relieve, geología y vegetación; vale decir: Parque Nacional Santa Rosa, Refugio Palo Verde, Parque Nacional de Corcovado, Reserva Biológica La Selva, Reserva de Monteverde, Las Cruces y el Cerro de la Muerte. Posteriormente se incluyen varias páginas sobre diversos e interesantes aspectos y patrones fisiológicos propios de las plantas tropicales. Antes de introducir al lector en una voluminosa lista comentada de especies de plantas tropicales, se incluye una lista de las especies de árboles presentes en los siete principales sitios de estudio citados.

El capítulo ocho trata sobre reptiles y anfibios. Aquí los autores de esta sección ofrecen un análisis ordenado de los patrones reproductivos, evolución, adaptaciones defensivas y hábitos alimentarios de los anfibios de Costa Rica. También se ofrecen algunas páginas dedicadas a las tortugas y los cocodrilos, lo mismo que una lista reciente de la herpetofauna costarricense, basada en las especies registradas principalmente en seis localidades. En la lista comentada de las principales especies herpetológicas se incluyen, además de anfibios, tortugas e iguanas, a las serpientes venenosas.

El capítulo nueve se refiere a los mamíferos. Se ofrecen aquí, en la introducción, aspectos interesantes acerca de la diversidad de este grupo de vertebrados en Costa Rica, su estacionalidad, frugivorismo en carnívoros, la abundancia tropical de los murciélagos y adaptaciones ecológicas de algunos grupos, entre otros. Al final de este capítulo, se incluye una extensa lista de la mastofauna costarricense, acompañada de algunas localidades. Posteriormente el análisis individual de las especies.

El capítulo diez, nos ofrece una interesante parte introductoria. Se hace énfasis aquí en la riqueza de especies de aves presentes en Costa Rica. Posteriormente presenta un análisis acerca de la composición de los principales grupos representados, las especies residentes y las migratorias, nos señala aspectos diversos sobre la zoogeografía, patrones de distribución, comunidades, estructuras tróficas, efectos climáticos, estacio-

nalidad, etc. El mismo autor de la parte introductoria presenta, posteriormente, una extensa lista anotada de las especies de la avifauna costarricense discutidas en el capítulo.

El capítulo correspondiente a los insectos, de por sí es uno de los más difíciles de escribir, presenta un enfoque muy interesante. Como el autor mismo lo advierte, el conocimiento que hoy todavía se tiene acerca de la ecología de los insectos de Costa Rica es proporcionalmente insignificante. En la parte correspondiente a la introducción, el autor inicia su capítulo con aspectos meramente ecológicos y la influencia de tales factores sobre las poblaciones de insectos. Por lo tanto, se analizan aspectos tales como estacionalidad, comportamiento reproductivo de algunos grupos y estrategias de protección a condiciones estacionales adversas del ambiente. También se dedican algunas páginas a los tipos de polinización por insectos observados en Costa Rica, insectos de islas y finalmente algunas apreciaciones dedicadas a las especies de insectos carroñeros.

Posteriormente se agregan listas de algunos grupos de insectos y, como última parte del capítulo, los ensayos cortos sobre diversas especies consideradas, por alguna razón, importantes.

En resumen, puede afirmarse que este es uno de los mejores legados que el Dr. Janzen le deja a los estudiosos de la ecología tropical y a Costa Rica. La coordinación y edición de esta obra general que desde ahora se convertirá en "clásica" y será de gran utilidad para los que se inician y los que quieren información proveniente de alguno de los numerosos especialistas que participaron en confección de esta obra sería importante que sus futuras ediciones de este libro se incluyan capítulos nuevos sobre temas ya estudiados en Costa Rica y que fueron omitidos en esta primera versión.

LUIS FERNANDO JIRON
MUSEO DE INSECTOS
UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

ABSORCION DE ^{15}N DE LOS FERTILIZANTES EN UNA ROTACION *Allium sativum* – *Setaria italica*, EN LISIMETROS¹ /

M. A. LAZZARI*
R. A. ROSELL*
M. R. LANDRISCINI**

Summary

*Nitrogen uptake by an annual rotation of garlic (*Allium sativum*) and millet (*Setaria italica*) from tagged urea and ammonium sulfate applied to a Typic Haplustoll in a battery of differential weighing lysimeters was studied during three years. The ^{15}N fertilizers were only applied to the garlic and the nitrogen recovery was determined in leaves, fruits (bulbs in garlic and seeds in millet), and roots of both crops.*

Each year total (added plus residual) tagged nitrogen was applied at a rate of ca. 20 g/m². The N recovery in the garlic crop was about 30% with a dry bulb yield of ca. 700 g/m² for both nitrogen treatments. The H uptake in the millet was approximately 15% and the grain yield oscilated between 1616 and 1105 g/m² with urea and between 1384 and 1236 g/m² with ammonium sulfate during the three years of the experiment

Introducción

La recuperación de nitrógeno aplicado como fertilizante ha sido extensivamente estudiada, con evidencias de que al menos un 50% del N adicionado es absorbido por un cultivo inicial (10, 12). En los últimos años se ha recurrido al uso de fertilizantes marcados con ^{15}N como trazadores del nitrógeno aplicado (6, 13) principalmente en instalaciones lisimétricas (3, 7), las que proporcionan resultados más realísticos sobre las transformaciones naturales del nitrógeno que aquellos obtenidos en invernadero (2).

La investigación aquí registrada involucró medidas de recuperación de nitrógeno del fertilizante aplicado a una rotación ajo (*Allium sativum*) – moha de Hungría (*Setaria italica*) realizada durante tres años consecutivos en lisímetros automáticos de pesada diferencial que contenían suelo Haplustoll típico de la región de Bahía Blanca, Argentina. El objetivo fue obtener información sobre la eficiencia del uso del nitrógeno en forma de urea y sulfato de amonio marcados con ^{15}N , aplicados al ajo, y el efecto residual sobre el cultivo de moha de Hungría. El ajo cubre el periodo invierno – primavera y requiere riegos suplementarios así como fertilización nitrogenada (11). La moha se desarrolla en verano, en condiciones de secano. Si bien se la cultiva desde hace varios años en La Pampa, Argentina, no ha alcanzado la difusión que merece por su productividad en relación al tiempo notablemente corto en que se cumple su ciclo (4)

Materiales y métodos

Lisímetros

Se utilizaron dos lisímetros automáticos cuya descripción ha sido realizada por Donnari y Rosell (5). Los mismos se encuentran ubicados en predios de la Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina y contienen suelo de la región (Haplustoll típico). La descripción del sitio y del perfil del suelo se detalló en un trabajo previo (11)

¹ Recibido para publicación el 30 de marzo de 1983.
Investigación llevada a cabo en el Laboratorio de Humus, Universidad Nacional del Sur (UNS), 8 000 Bahía Blanca, Argentina.
Los autores desean expresar su sincero agradecimiento a la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Nación (SECyT) por su apoyo económico. También desean agradecer a la Fundación A. von Humboldt de la República Federal de Alemania, por la donación de compuestos marcados con nitrógeno-15.

* Profesores Adjunto y Titular, respectivamente, del Departamento de Ciencias Agrarias de la UNS, 8 000 Bahía Blanca, Argentina.

** Técnica Profesional, Personal de Apoyo del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires, Argentina

Prácticas culturales

Se empleó anualmente semilla seleccionada de ajo, cultivar Colorado y de moha de Hungría, cultivar Gigante. Las prácticas culturales a que se sometieron el suelo y los cultivos durante los tres años (mayo 1978 – abril 1981) se detallan en el Cuadro 1.

Los cultivos de ajo recibieron riegos de mantenimiento cuando las condiciones climáticas lo requerían. El primer cultivo de ajo (año 1978) sufrió el ataque de un agente patógeno y por ello no se realizaron los análisis de las plantas.

Siendo la moha un cultivo de secano, no recibió riegos durante el primer año. La moha en la segunda rotación fue sembrada el 31 de diciembre de 1979. Hacia fines del mes de enero de 1980, los lisímetros permanecían con una escasa densidad de plantas, probablemente debido a la pobre precipitación pluvio-

métrica de ese mes (Cuadro 2). Se volvió entonces a sembrar la moha el 8 de febrero de 1980, efectuándose riegos de mantenimiento del cultivo hasta que las plantas alcanzaron una altura de 10 cm. La moha del tercer año también requirió riegos en el primer estadio de su crecimiento. En el Cuadro 3 se muestran las lluvias caídas y los riegos efectuados para cada uno de los períodos vegetativos de ambos cultivos.

En el primer ciclo de la moha se cortaron, al ras de la superficie, las plantas que componían medio lisímetro fertilizado con urea. Ese corte se realizó el 7 de febrero de 1979, antes que se desarrollaran las panojas, con el objeto de conocer la recuperación de nitrógeno en caso de someter el cultivo al pastoreo o a cortes.

Fertilizantes

Uno de los lisímetros fue fertilizado los tres años y durante el ciclo de desarrollo del ajo, con sulfato

Cuadro 1. Cronograma de prácticas culturales en rotación ajo-moha, 1978-1981.

Primera rotación ajo-moha (Mayo 1978 – Abril 1979)	
Mayo 7, 1978	– El suelo se escardilló, rastrilló y preparó.
Mayo 15	– Se aplicó una fertilización base de 10 g P_2O_5/m^2 y 6 g K_2/m^2
Mayo 22	– Los dientes de ajo colorado tipo exportación se curaron con un fungicida sistémico CERCOBIN-NF-44. – Se plantaron los dientes de ajo a razón de 11 dientes por metro lineal de hilera, en surcos espaciados 50 cm cada uno, lo que hace un total de 44 dientes por metro cuadrado – El suelo próximo a los dientes se trató con un insecticida-acaricida sistémico THIMEI (Phorate) a razón de 2 g/ m^2 . Este tratamiento se repitió mensualmente por un total de 3 veces.
Agosto 1	– Fertilización nitrogenada; primera dosis de 10 g N/ m^2 en forma de $(^{15}NH_4)_2SO_4$ y $(^{15}NH_2)_2CO$ respectivamente
Septiembre 26	– Fertilización nitrogenada; segunda dosis de 10 g N/ m^2 en forma de $(^{15}NH_4)_2SO_4$ y $(^{15}NH_2)_2CO$ respectivamente
Diciembre 12	– Se retiraron todas las plantas de los lisímetros. La cosecha fracasó por ataque de un agente patológico
Diciembre 20	– Desinfección del suelo de los lisímetros con bromuro de metilo gaseoso.
Diciembre 23	– El suelo se escardilló, rastrilló y preparó.
Diciembre 26	– Siembra de moha a razón de 1.4 g de semillas/ m^2 , en 6 surcos por metro cuadrado, separados 15 cm
Abril 10, 1979	– Cosecha de moha. Se cortaron las plantas al ras de la superficie; se secaron en estufa a 60°C. Se separaron las panojas. Se extrajo un plan de suelo de 50 cm de lado y 50 cm de profundidad de donde se separaron las raíces a mano; aquellas que quedaron retenidas en tamiz de 1 mm se secaron en estufa a 60°C. Se volvió el suelo a su respectivo lisímetro.

Segunda rotación ajo-moha (Junio 1979 – Junio 1980)

Mayo 25	-- Se aplicó una fertilización base de 10 g $\text{P}_2\text{O}_5/\text{m}^2$ y 6 g $\text{K}_2\text{O}/\text{m}^2$
Junio 2	-- Se plantaron los dientes de ajo de igual forma que en mayo 22, 1978, que hace un total de 44 dientes por metro cuadrado
Septiembre 6	-- Fertilización nitrogenada a razón de 15 g N/m^2 en forma de $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y $(^{15}\text{NH}_2)_2\text{CO}$ respectivamente
Diciembre 13	-- Cosecha del cultivo.
Diciembre 21	-- Se sembró la moha de igual forma que el 26 de diciembre de 1979
Febrero 7, 1980	-- Se vuelve a sembrar moha de la misma forma anterior
Junio 3	-- Cosecha del cultivo idem al 10 de abril de 1979

Tercera rotación ajo-moha (Junio 1980 – Abril 1981)

Junio 18	-- Fertilización base idem años anteriores.
Junio 19	-- Se plantaron los dientes de ajo de igual forma que en años anteriores.
Septiembre 9	-- Fertilización nitrogenada a razón de 10 g N/m^2 en forma de $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y $(^{15}\text{NH}_2)_2\text{CO}$ respectivamente
Diciembre 9	-- Cosecha del cultivo idem años anteriores.
Diciembre 26	-- El suelo se escardilló, rastrilló y preparó
Diciembre 29	-- Siembra de moha de Hungría de igual forma que en años anteriores.
Abril 23, 1981	-- Cosecha del cultivo idem años anteriores. No se extrajeron las raíces.

Cuadro 2. Distribución de lluvias y riegos durante el experimento 1978-1981.

Mes	1978		1979		1980		1981	
	Lluvia	Riego	Lluvia	Riego	Lluvia	Riego	Lluvia	Riego
mm								
Enero	610	--	148.8	--	23.7	--	66.5	200
Febrero	110.9	--	74.5	--	7.3	20.0	73.1	--
Marzo	126.3	--	94.4	--	262.2	--	89.9	--
Abril	21.0	--	17.9	--	113.0	--	92.0	--
Mayo	36.6	--	42.1	--	58.8	--	60.5	--
Junio	4.3	10.0	0.6	10.0	16.2	--	26.1	--
Julio	61.0	--	3.7	--	69.4	--	--	--
Agosto	47.5	10.0	31.0	--	5.6	10.0	--	--
Setiembre	56.0	10.0	32.8	10.0	17.5	20.0	--	--
Octubre	50.0	20.0	71.9	30.0	75.9	30.0	--	--
Noviembre	62.5	20.0	60.1	30.0	39.7	30.0	--	--
Diciembre	84.7	--	117.6	--	8.9	--	--	--
Total	720.8	--	695.4	--	698.2	--	--	--

Cuadro 3. Lluvias y riegos durante el ciclo vegetativo de los cultivos, 1978-1981.

Año	Cultivo	Periodo ciclo vegetativo	Lluvias (mm)	Riegos (mm)
1978**	Ajo	22-5-78 al 12-12-78	292.1	70
1979	Moha	26-12-78 al 10-4-79	322.1	-
	Ajo	2-6-79 al 13-12-79	234.5	80
1980	Moha	8-2-80 al 3-6-80	452.0	20
	Ajo	19-6-80 al 9-12-80	211.5	90
1981	Moha	29-12-80 al 23-4-81	321.5	20

** Cultivo perdido.

de amonio marcado y el otro con urea marcada. Las cantidades aplicadas anualmente se presentan en el Cuadro 4. Los fertilizantes fueron disueltos en 10 litros de agua y distribuidos sobre la superficie de los lisímetros para obtener buena uniformidad en su distribución. Fue necesario que la superficie de los suelos estuviera razonablemente seca, de forma que el líquido infiltrara rápidamente.

Muestras de suelo y material vegetal

Después de las cosechas de los cultivos se extrajeron muestras de suelo, cada 20 cm hasta una profundidad de 100 cm, las que fueron analizadas para nitrógeno total y relación isotópica con el fin de determinar el nitrógeno residual.

El nitrógeno total de las muestras de diferentes partes de las plantas de ajo (hojas, bulbos y raíces) y de moha (hojas y tallos, grano y raíces) se determinó según el método macro-Kjeldahl para incluir nitratos (1). Para cada muestra se realizaron dos determinaciones las que se promediaron. Los destilados se acidificaron con HCL, se redujeron a un volumen pequeño y en ellos se determinó la relación isotópica $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$, previa oxidación a N_2 con hipobromito de sodio (9). Para cada destilado se realizaron dos determinaciones espectrométricas con espectrómetro de emisión Q24-Zeiss Jena (14), de modo que se obtuvieron cuatro resultados de la relación isotópica por cada muestra, los que se promediaron.

Resultados y discusión

En el Cuadro 5 se presentan los valores de nitrógeno recuperados por los cultivos del suelo del lisímetro fertilizado con sulfato de amonio. Los valores correspondientes para el tratamiento urea se muestran en el Cuadro 6, donde se incluyen también los resultados obtenidos del corte de moha efectuado antes de la formación de las panojas (45 días después de la

siembra). El n recuperado, en $\text{mg N}/\text{m}^2$, fue obtenido con la siguiente ecuación (8):

$$\frac{\text{mg Exc. } ^{15}\text{N}/\text{m}^2 (\text{planta}) \cdot \text{mg N}/\text{m}^2 (\text{aplicados})}{\text{mg Exc. } ^{15}\text{N}/\text{m}^2 (\text{aplicados})}$$

donde:

$\text{mg Exc. } ^{15}\text{N}/\text{m}^2 (\text{planta}) = \text{mg exceso, sobre la abundancia natural, de } ^{15}\text{N} \text{ en la planta, por } \text{m}^2 \text{ de superficie y}$
 $\text{mg Exc. } ^{15}\text{N}/\text{m}^2 (\text{aplicados}) = \text{idem al anterior, aplicados al suelo.}$

Primera rotación ajo – moha

El lisímetro fertilizado con urea proporcionó un rendimiento de moha superior al tratamiento con sulfato de amonio, si bien ambos cultivos recuperaron cantidades similares de nitrógeno aplicado durante el cultivo de ajo. Con más exactitud, 16.6% el tratamiento sulfato de amonio y 15.6% el tratamiento urea. El primer tratamiento proporcionó una recuperación en los granos de 10.68%, y el conjunto hojas y tallos de 5.92%. El segundo, brindó valores semejantes de N recuperado tanto en el grano como en el conjunto hojas y tallos (8.33% y 7.21% respectivamente) y absorbió mayores cantidades de nitrógeno proveniente de otras fuentes (el grano 82.5%, y las hojas y tallos 73.7% del nitrógeno total absorbido).

El ciclo de la moha fue de 105 días y a los 45 días de la siembra (corte de plantas enteras realizado el 7 de febrero de 1979) ya el cultivo, cuyo suelo fue tratado con urea, recuperó el 10.34% de nitrógeno. O sea que, antes del desarrollo de las panojas, la moha absorbió el 66% de la totalidad del nitrógeno recuperado (Cuadro 5).

Las raíces de moha, en ambos tratamientos, mostraron una proporción de nitrógeno total superior al conjunto hojas y tallos y una muy baja recuperación de nitrógeno del fertilizante.

Cuadro 4. Fertilizante nitrogenado marcado con ^{15}N

Año	% átomos de ^{15}N		Fecha de Aplicación	Cantidad agregada gN m^{-2}	Residual		Total	
	$(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$(^{15}\text{NH}_2)_2\text{CO}$			$(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$(^{15}\text{NH}_2)_2\text{CO}$	$(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$(^{15}\text{NH}_2)_2\text{CO}$
1978	8.12	10.20	agosto 1	10	—	—	—	—
			setiembre 26	10	—	—	20.00	20.00
1979	2.88	4.76	setiembre 6	15	6.43	6.51	21.43	21.51
1980	7.20	8.16	setiembre 9	10	11.96	10.42	21.96	20.42

Segunda rotación ajo — moha

El rendimiento de los bulbos de ajo fue levemente superior en el tratamiento urea (700 g/m^2), los que recuperaron 29.29% de nitrógeno, residual más adicionado. El tratamiento sulfato de amonio rindió un peso seco de bulbos de 670 g/m^2 los que absorbieron 28.49% de ese nitrógeno. Las hojas y raíces recuperaron cantidades pequeñas de nitrógeno, totalizando ambas 1.69% y 1.65% en el tratamiento urea y sulfato de amonio, respectivamente. El suelo que recibió urea proporcionó una recuperación total de N de 30.98%, y el que recibió sulfato de amonio, 30.04%.

El cultivo de moha fue cosechado sin que el grano alcanzara su estado de maduración por lo expuesto en la sección de Materiales y Métodos. Consecuentemente, los valores de N recuperado fueron inferiores a los del año anterior (8.48% y 11.76% en el tratamiento sulfato de amonio y urea, respectivamente). Los rendimientos, especialmente de granos, fueron también bajos. Además, los contenidos de nitrógeno total en el conjunto hojas y tallos y raíces fueron elevados, lo que denota que el cultivo no contó con el tiempo adecuado y suficiente para su normal crecimiento y maduración. Esto está corroborado por la baja recuperación de nitrógeno por los granos inmaduros de moha (1.36% y 1.49% en el tratamiento sulfato de amonio y urea, respectivamente).

Tercera rotación ajo — moha

La cantidad de agua recibida por el ajo fue similar a la del año anterior (Cuadro 3). También los rendimientos fueron similares ya sea entre tratamientos y con respecto a la cosecha del ciclo anterior. Además, ambos cultivos recuperaron cantidades similares de nitrógeno, adicionado más residual (33.80% el tratamiento sulfato de amonio y 33.28% el tratamiento urea). Las hojas y raíces recuperaron cantidades muy pequeñas y similares de N en ambos tratamientos, o sea 0.85% el tratamiento sulfato de amonio y 0.81% el tratamiento urea.

El tercer cultivo de moha rindió un peso seco de hojas y tallos (1.236 g/m^2) y de granos (374 g/m^2) superior a los valores obtenidos en el tratamiento con urea (1.105 y 354 g/m^2 , respectivamente). Durante este período, el cultivo recibió 321 mm de lluvia, igual cantidad que durante el primer ciclo (Cuadro 3) aunque diferentemente distribuida (Cuadro 2). Como consecuencia, el cultivo realizó su primer desarrollo con una inferior humedad del suelo, lo que pudo haber provocado rendimientos también inferiores a los obtenidos en el año 1979.

El tratamiento sulfato de amonio absorbió 18.65% de nitrógeno residual, mientras que el tratamiento urea absorbió el 13.02% de ese nitrógeno (sin incluir raíces, las que no fueron extraídas esta vez). Además, en ambos tratamientos los granos absorbieron aproximadamente el doble de nitrógeno que el conjunto hojas y tallos. Similarmente a lo ocurrido en la moha de la primera rotación, el tratamiento urea absorbió mayores cantidades de nitrógeno proveniente de otras fuentes (65.0% el grano y 73.2% el conjunto hojas y tallos) que el tratamiento sulfato de amonio (56.6% y 58.3%, respectivamente). Esto induciría a pensar que la urea favorecería una mayor movilización y absorción del nitrógeno nativo del suelo (Cuadros 5 y 6).

Conclusiones

Este estudio permite concluir bajo las condiciones experimentales mencionadas y a la zona de influencia de Bahía Blanca que:

1. El cultivo de ajo absorbe aproximadamente el 30% del nitrógeno de los fertilizantes, urea o sulfato de amonio con rendimientos similares en ambos tratamientos.
2. La moha de Hungría recupera alrededor del 15% del nitrógeno adicionado al ajo, proporcionando rendimientos muy importantes de materia seca.

Tabla 5. Rendimiento del cultivo y absorción de nitrógeno en rotación ajo-moha. Tratamiento ($^{15}\text{NH}_4$) $_2\text{SO}_4$, 1978-1981.

Cultivo	Muestra	Rendimiento g m ⁻²	NITROGENO		N Recuperado		N absorbido de otras fuentes	
			Total %	N ¹⁵ mg Exc. m ⁻²	mg m ⁻²	% del fert.	mg m ⁻²	%
Primera rotación ajo-moha (Mayo 1978 - Abril 1979)								
Moha	Hojas y tallos	1 384	0.280	97.7	1 184	5.92	2 691	69.4
	Granos	396.0	1.640	176.4	2 137	10.68	4 357	67.1
	Raíces	1.02	0.420	0.09	1.09	0.005	3.19	74.5
Segunda rotación ajo-moha (Junio 1979 - Junio 1980)								
Ajo	Hojas	89.5	1.039	11.5	290.3	1.35	639.7	68.8
	Bulbos	670.0	2.158	241.9	6 106	28.49	8 352	57.8
	Raíces	16.0	1.053	1.77	44.6	0.20	123.4	73.5
Moha	Hojas y tallos	579.0	1.233	58.63	1 499	6.99	5 640	79.1
	Granos	67.6	1.801	12.71	320.8	1.49	896.2	73.6
	Raíces	1.05	1.011	0.08	2.01	0.009	8.60	81.1
Tercera rotación ajo-moha (Junio 1980 - Abril 1981)								
Ajo	Hojas	92.3	0.561	9.60	139.3	0.63	378.7	73.1
	Bulbos	696.0	2.887	498.7	7 238	32.95	12 855	64.0
	Raíces	17.7	0.970	3.35	48.6	0.22	123.4	71.7
Moha	Hojas y tallos	1 236	0.299	106.3	1 542	7.02	2 154	58.3
	Granos	374	1.573	176.0	2 554	11.63	3 329	56.6

Cuadro 6. Rendimiento del cultivo y absorción de nitrógeno en rotación ajo-moha. Tratamiento (¹⁵NH₄)₂CO₃, 1978-1981.

Cultivo	Muestra	Rendimiento		Nitrógeno		N Recuperado		N absorbido de otras fuentes	
		g m ⁻²	g m ⁻²	Total %	N ¹⁵ mg Exc. m ⁻²	mg m ⁻²	% del fert.	mg m ⁻²	%
Primera rotación ajo-moha (Mayo 1978 - Abril 1979)									
	Parte aérea corte del 7-2-79	930		1.070	216.3	2.069	10.34	7.882	79.2
Moha	Hojas y tallos	1 616		0.340	150.9	1 443	7.21	4 051	73.7
	Granos	498		1.910	174.3	1 667	8.33	7 844	82.5
	Raíces	1.72		0.730	0.25	2.39	0.011	10.11	80.8
Segunda rotación ajo-moha (Junio 1979 - Junio 1980)									
Ajo	Hojas	82.3		1.011	18.3	285.4	1.32	546.6	65.7
	Bulbos	700.0		2.227	405.2	6 302	29.29	9 287	59.6
	Raíces	18.5		1.455	5.1	79.3	0.37	189.7	70.5
Moha	Hojas y tallos	652.0		1.372	136.3	2 120	9.85	6 825	76.3
	Granos	80.6		2.342	26.3	409.0	1.90	1 478	78.3
	Raíces	1.37		0.984	0.16	2.48	0.011	11.02	81.6
Tercera rotación ajo-moha (Junio 1980 - Abril 1981)									
Ajo	Hojas	85.4		0.519	10.4	125	0.61	318	71.8
	Bulbos	708.0		3.201	550.5	6 632	32.47	16 031	70.7
	Raíces	20.0		0.984	3.48	41.9	0.20	155	78.7
Moha	Hojas y tallos	1 105		0.286	70.3	846.9	4.15	2 313	73.2
	Granos	354		1.462	150.4	1 812	8.87	3 362	65.0

3. Los dos cultivos de la rotación absorben aproximadamente el 45% del nitrógeno aplicado (Cuadro 4)

4. Los rendimientos anuales de los cultivos se mantienen al disminuir las dosis anuales de los fertilizantes.

5. La rotación ajo-moha puede efectuarse anualmente si se dispone de suficiente agua. Como el ajo es un cultivo que requiere riego, es factible proporcionar al cultivo de moha una adecuada humedad del suelo en la primera etapa de su crecimiento. La moha de Hungría podría destinarse a pastoreo o a la producción de semilla. Además, su rápido crecimiento permitiría evitar el desarrollo de malezas y mejorar el suelo incorporándolo al mismo uno a dos meses antes de la nueva implantación de los ajos.

Resumen

En este trabajo se estudió la absorción de nitrógeno en una rotación anual de ajo (*Allium sativum*) y mijo (*Setaria itálica*); en nitrógeno se aplicó como urea y sulfato de amonio marcada a un Typic Haplus-toll en varios lisímetros durante tres años. El ^{15}N del fertilizante se aplicó solamente al ajo, siendo el nitrógeno derivado del fertilizante (N dff) determinado en las hojas, frutas (bulbas para el ajo y semillas para el mijo) y las raíces de ambos cultivos. Cada año el nitrógeno total marcado (adicionado más residual) se mantuvo a un nivel aproximado de 20 g/m^2

El N dff en el cultivo de ajo estuvo alrededor del 30% con un rendimiento aproximado de bulbo seco de 700 g/m^2 para ambos tratamientos nitrogenados. El N ff en el cultivo del mijo fue alrededor del 15% y los rendimientos de grano oscilaron entre 1616 y 1105 g/m^2 con urea y entre 1384 y 1236 g/m^2 con sulfato de amonio durante los tres años del experimento.

Literatura citada

- 1 BREMMER, J. M. Total Nitrogen. In: Black C. A. ed. Methods of soil analysis. Agronomy No. 9. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, W. S. A. 1965. pp. 149-178.
- 2 BURFORD, J. R. Determination of losses of nitrogen from soils in the humid tropics by lysimeters studies. In: Ayanaba and Dart eds. Biological Nitrogen fixation in farming systems of the Tropics. John Wiley and Sons. 1977. pp. 353-363.
- 3 CHICHESTER, F. W. y SMITH, S. J. Disposition of ^{15}N -labelled fertilizer nitrate applied during corn culture in field lysimeters. Journal of Environmental Quality, 7(2):227-233. 1978.
- 4 COVAS, G. M. Producción rápida y segura de pasto o de grano en la región semiárida pampeana. INTA, Estación Agropecuaria de Anguil, La Pampa, Argentina. Circular de Extensión No. 26. 1969.
- 5 DONNARI, M. A., ROSELL, R. A. y TORRE, L. Productividad del ajo. II. Evapotranspiración real y necesidad de agua. Turrialba, Costa Rica, 28(4):331-337. 1978.
- 6 DOWDELL, R. J. y CREES, R. The uptake of ^{15}N -labelled fertilizer by winter wheat and its immobilization in a clay soil after direct drilling or ploughing. Journal of the Science of Food and Agriculture. 31(10):992-996. 1980.
- 7 DOWDELL, R. J. y WEBSTER, C. P. A lysimeter study using nitrogen-15 on the uptake of fertilizer nitrogen by perennial ryegrass swards and losses by leaching. Journal of Soil Science. 31(1):65-75. 1980.
- 8 EDWARDS, A. P. y HAUCK, R. D. Nitrogen-15 depleted versus nitrogen-15 enriched ammonium sulphate as tracers in nitrogen uptake studies. Soil Science Society of American Proceedings. 38(5):765-767. 1974.
- 9 FIEDLER, R. y PROKSCH, G. The determination of nitrogen 15 by emission and mass spectrometry in biochemical analysis: a review. Analytica Chimica Acta. 78:1-62. 1975.
- 10 HAUCK, R. D. Quantitative estimates of nitrogen-cycle processes. Concepts and review. In: Nitrogen-15 in soil-plant studies. International Atomic Energy Agency. Vienna, Austria. 1971. pp. 65-80.
- 11 LAZZARI, M. A., ROSELL, R. A. y LANDRIS-CINI, M. R. Productividad del ajo. I. Fertilización nitrogenada y riegos. Turrialba, Costa Rica. 28(3):245-251. 1978.
- 12 LEGG, J. O. y ALLISON, F. E. A tracer study of nitrogen balance and residual availability with 12 soils. Soil Science Society of American Proceedings. 31:403-406. 1967.

13. POMARES-GARCIA, F. y PRATT, P. F. Recovery of ^{15}N -labelled fertilizer from manured and sludge-amended soil. *Soil Science Society of American Journal*. 42:717-720. 1978.
14. SOMMER, K. y KICK, H. Auf eine Eichkurve bezogene emissiospektrographische ^{15}N -Bestimmung mit dem Spektrographen Q24-Zeiss. *Zeitschrift für analytische Chemie*, 220:21-26. 1975.

Notas y comentarios

Isoácidos para aumentar la producción de leche

Un nuevo aditivo para los alimentos del ganado lechero, desarrollado en la Michigan State University (MSU), en East Lansing, por el Dr. Roberto Cook, promete ser un importante avance en la producción de leche. El aditivo, compuesto de isoácidos, aumenta la producción por animal, y es fruto de investigaciones realizadas por Cook durante muchos años de labor profesional en la MSU (*Futures*, March 1984, p. 8).

El término isoácidos se refiere a una mezcla de cuatro sustancias químicas; ácido isobutírico, ácido isovalérico, ácido butírico 2-metil, y ácido valérico. Estas sustancias naturales son producidas por todas las células mamarias. Las investigaciones de Cook, iniciadas en 1962, establecieron que estas cuatro sustancias incrementaban el crecimiento de bacterias en el rumen de la vaca, lugar donde comienza la digestión de los forrajes.

Ciertas bacterias del rumen son altamente eficientes en digerir el forraje. Estas importantes bacterias necesitan isoácidos para su crecimiento y desarrollo.

Tomó años de investigación básica de laboratorio para aislar los isoácidos y encontrar una mezcla que promovía el más eficiente crecimiento bacteriano. Estos años en el laboratorio fueron seguidos por otros de experimentos en pequeña escala con animales y ensayos de campo en escala comercial.

Mediante pruebas con cientos de vacas en 11 universidades estatales, los isoácidos han demostrado su capacidad de aumentar la eficiencia del forraje en cifras de 8 a 10 por ciento. Este aumento de 10 por ciento significa que los agricultores podrían producir la misma cantidad de leche con un 10 por ciento menos de forraje, o producir 10 por ciento más con la misma cantidad de forraje.

Al estimular la fermentación que ocurre en el rumen, los isoácidos pueden permitir que las vacas digieran algunos subproductos no utilizados hasta ahora. Experimentos recientes, que Cook ha llevado a cabo con ovinos en los trópicos mexicanos, han aumentado la digestibilidad de las coronas terminales de las piñas con suplemento de isoácidos, urea y azufre.

Sean o no aceptados inmediatamente los isoácidos por los ganaderos lecheros, sin duda otros científicos harán estudios derivados de la investigación de Cook. Un artículo sobre su trabajo está publicándose en el número del *Journal of Dairy Science* correspondiente a marzo de 1984. Adalberto Gorbitz.

Notas y comentarios

Granadilla que atrae hormigas mediante golosinas

Son ya comunes las relaciones entre insectos y plantas. La más conocida es la polinización, en la que los insectos cambian sus servicios como acarreadores de polen por un poco de néctar. Sin embargo, algunas plantas consiguen una alianza más estrecha con sus insectos asociados.

Las asociaciones simbióticas entre hormigas y árboles de acacia (en las que la planta provee alimento y refugio, y las hormigas suministran una fuerza volante de seguridad que repele a casi todos los invasores) son un ejemplo notable de coevolución entre hormigas y plantas. Las acacias abastecen a las hormigas con néctar secretado por glándulas especiales en la base de cada hoja. Las hormigas a menudo habitan en las espigas nuevas de la planta y patrullan constantemente los alrededores de su vivienda, ahuyentando a los invertebrados que comen partes de la acacia.

La mayor parte de estas relaciones se encuentran en los trópicos y subtropicos. Un ejemplo de asociación similar en la zona templada ha sido recientemente descrita por D. Kelly McLain, de la Universidad de Emory, en Atlanta, Georgia (*American Midland Naturalist* vol. 110, p. 433). McLain observó una asociación entre la enredadera de la pasión (*Passiflora incarnata*), una especie del mismo género que la granadilla, y un número de especies diferentes de hormigas.

Al igual que las acacias, esta granadilla tiene nectarios que ocurren en pares tanto en el peciolo como en las brácteas que están situadas en la base de las flores y yemas. Mientras que los nectarios florales producen néctar sólo en momentos específicos durante el día, los nectarios extraflorales secretan néctar continuamente. Este abastecimiento constante de néctar es un factor importante para atraer un gran número de hormigas a la planta.

McLain notó que cinco especies de hormigas visitaban la *Passiflora* durante el curso del día para tomar néctar de los nectarios extraflorales y que las visitas

de las diferentes especies rara vez se traslapaban, proveyendo a la planta con una protección continua. Las hormigas que visitaban las enredaderas atacaban a moscas, escarabajos y saltamontes, impidiendo eficazmente que estos insectos se alimentasen de las hojas, yemas y flores de la pasión. Cuando se eliminaron de una planta las glándulas productoras, disminuyó el número de hormigas visitantes, mientras que aumentó la tasa de pastoreo por los insectos herbívoros. Las plantas protegidas por las hormigas defensoras produjeron más frutos que las plantas sin guardianes, y las hormigas se observaron que hasta podaban las hojas viejas que ya no producían néctar. En una planta, las hormigas habían establecido residencia permanente en los tallos huecos de la enredadera, suministrándole así una fuerza de seguridad interna y residente.

¿Cómo se compara la protección dada por las hormigas a su planta hospedante con otros métodos que las plantas han desarrollado para defenderse contra el ataque de los insectos? Las plantas producen un número de compuestos tóxicos y nocivos, que se supone repelen a los herbívoros. Alcaloides, resinas, taninos y una variedad de otros compuestos se piensa que proveen a la planta con un armamento químico. Las sustancias secretadas por los nectarios extraflorales de la pasión y de la acacia pueden también ser consideradas como una defensa química, porque esta producción de néctar a final de cuentas juega un papel disuasivo ante los pastadores. La síntesis de azúcares sencillos y aminoácidos que conforman el néctar pueden aún costar menos energía que la producción de compuestos químicos más elaborados usados para la defensa más directa.

Si la planta usa disuasivos estrictamente químicos, tiene que producir entonces cantidades suficientes de las sustancias tóxicas para hacer repelente a la planta entera. Si las hormigas son empleadas en la estrategia defensiva de las plantas, por el contrario, sólo se necesita suficiente néctar para atraer suficientes defensores. McLain y otros también han señalado otra ventaja en usar golosinas para atraer una fuerza defensiva móvil y activa. Es probablemente mucho más difícil para un herbívoro desarrollar una defensa contra una horada de hormigas que muerden y pican, que desarrollar los cambios fisiológicos necesarios para adquirir resistencia a tóxicos y repelentes. Adalberto Gorbitz.

Resumen

La máxima producción de esporas de Colletotrichum gloeosporioides en agua colectada de árboles de cítricos coincide con la época de floración, la mayor concentración de esporas ocurre durante enero y marzo cuando se presenta el principal período de floración y coincide con la mayor caída de frutas proveniente de ese período de floración. Entre épocas de floración se encuentran números moderados de conidias pero las inflorescencias no son siempre afectadas. La correlación entre el número de esporas de Fusarium y la floración no es tan consistente como en el caso de las esporas de Colletotrichum.

Se encontró peritecios de Glomerella cingulata en hojas de cítricos descomponiéndose en el suelo y en menor cantidad en el agua recogida de los árboles; la infección primaria de las inflorescencias se atribuye principalmente a los conidios de C. gloeosporioides proveniente de floraciones fuera de ciclo aunque conidios por filopiana de Colletotrichum puede también ser un agente casual.

Introduction

Since its discovery in Belize in 1956/57, post-bloom fruit drop disease, associated with a form of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. (2, 4, 5), has become of increasing economic importance to the citrus growers of Stann Creek Valley, and to the citrus industry of Belize. In this disease, the infection of the blossoms results in abnormal abscission of fruitlets and considerable reduction of the crop can result from severe attacks (4).

Of the two blossoming seasons of citrus in Belize, severe infection occurs only in the main bloom of January to March, from which approximately 95% of the annual crop is normally derived. Fruitset on individual, severely-infected trees may be completely prevented and more than 50% of the annual crop in such groves may be lost. This main flowering season coincides with cool, rather dry weather; the second flowering season usually occurs in June to July when

both rainfall and temperature are high, and disease level is usually light to moderate, depending on location. However during the main season, areas subject to high amounts of rainfall are proportionally more badly affected than those receiving very low rainfall. In the Stann Creek area, rainfall increases from a comparatively low level towards the coast, to a high level at the head of the citrus belt (approx. 37 km inland from the coast); disease attacks are generally more severe at such inland locations.

This paper describes experiments conducted in 1971–73 (3) to measure the seasonal abundance of *Colletotrichum* spores in infected groves, in relation to incidence of rainfall and occurrence of blossoms. Such information is considered useful in elucidating the course of the epidemic and in planning control measures.

Materials and methods

Assessment of disease incidence and severity. Postbloom fruit drop disease is recognized by two main symptoms. These consist of (a) initial attacks on the flowers, causing distinct pink to brown spots on the petals which later become completely blighted; (b) this is followed by the second stage when fruitlets abscise leaving the conspicuous enlarged calyces (buttons) of the infected flowers on

¹ Received for publication on August 12, 1982.

* Citrus Research Station, Citrus Growers Association, Stann-Creek Valley, Belize, C.A.
Present address: Faculty of Agriculture Unit, University of the West Indies, Mona, Kingston 7 Jamaica, W.I.

the branches (4). The incidence of the disease can therefore be determined by the presence of infected flowers, or disease buttons which persist on the branches for one year or more. The severity of the disease is roughly proportional to the abundance of infected flowers or to numbers of buttons remaining on the trees. Disease can thus be rated as being absent, light, moderate or heavy according to the absence or increasing abundance of infected flowers on buttons on the branches.

Spore trapping. Four spore traps were placed in each of three groves in the Stann Creek Valley in December 1971. Traps in one grove were serviced until November 1972, and in two groves, until October, 1973. The traps consisted essentially of a rain shield, funnel and container (Figure 1). The rain shield was a piece of heavy-duty aluminum foil supported at the edges by a 25.0 cm frame of wire (2.6 mm diameter); the funnel was a 15.0 cm diameter inverted cone of aluminum foil supported on a two-looped wire frame; the container was 200 or 250 ml glass flask, the larger flask being preferable during periods of high rainfall to prevent overflow. A triangular gutter of aluminum foil was attached across the base of the rain shield which served to exclude direct drifts of rain water from entering the funnel and to collect splashed water from the trees. By means of a long pole secured horizontally within the tree, each trap was suspended at the periphery of a tree canopy, 1.2 – 1.5 m above ground.

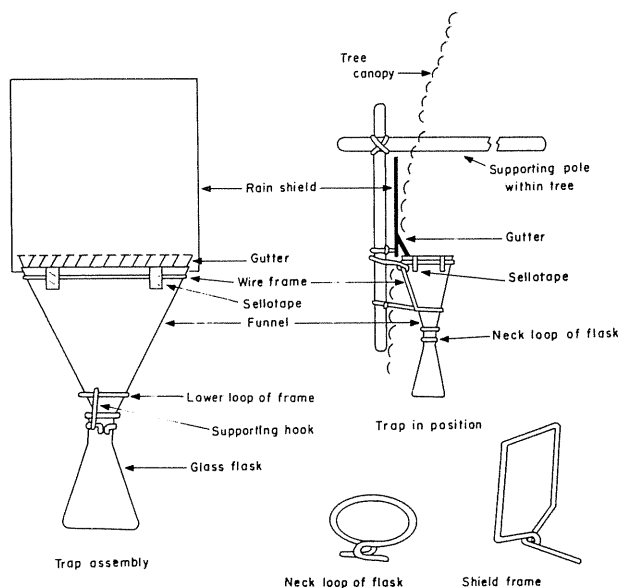


Fig. 1. An apparatus for collecting splash-dispersed spores of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus trees.

Traps were set out once a week and emptied usually on the morning following rainfall during the previous 24 h. At each servicing, observations were made of the state of flush and occurrence of infected flowers. Periods between recorded servicing were not constant as they depended on rainfall producing a minimum of 50 ml total rain water/grove. Volumes below this were not recorded. Water collected in the traps in each grove was bulked and measured. A 150 ml aliquot of the sample was used except where the total volume collected was less than this, when the whole sample was processed. The sample was filtered through a thin layer of absorbent cotton wool to remove coarse debris; a 50 ml aliquot of this was centrifuged for spore assessment, but 45 ml was used where the original sample did not permit more than this. To facilitate rapid identification of spores, a few drops a 0.1% cotton blue-lactophenol stain were added to the filtered water before an aliquot was taken for centrifuging.

The sediment was taken up in the last 4.5 – 7.0 ml (usually 5.0 ml) of the centrifuged aliquot and spore counts were done on two 7/^{u1} drops. Twenty low power (x 60) microscope fields, covering a known area of the coverslip on each drop, were scanned and the average count/drop of concentrate was calculated from this. The concentration of spore/ml of original sample was then calculated.

Field observations. In addition to routine observations on disease levels in various citrus groves in the main citrus belt of the Stann Creek Valley, visits were paid to groves in the Cayo District in the west of Belize and to Corozal District in the north, where decreasing quantities of citrus are also produced. The level of disease incidence, and data on rainfall in those areas were noted.

Both prior to, and during the course of the spore trapping experiments, regular field examination of flowers, dead twigs and leaves, and old buttons were made to discover the presence of any perithecia of *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spaulding & Schrenk, the perfect state of *C. gloeosporioides*.

Results

Peaks of spore concentration coincident with the blossoming seasons occurred in all groves (Figure 2). The greatest numbers of spores were present during the main bloom, but conidia were present in moderate numbers between blossoming seasons. In November 1972, few blossoms were recorded in groves A and B and those found were usually uninfected. The sources of the conidia producing the peaks during that month were not evident. There

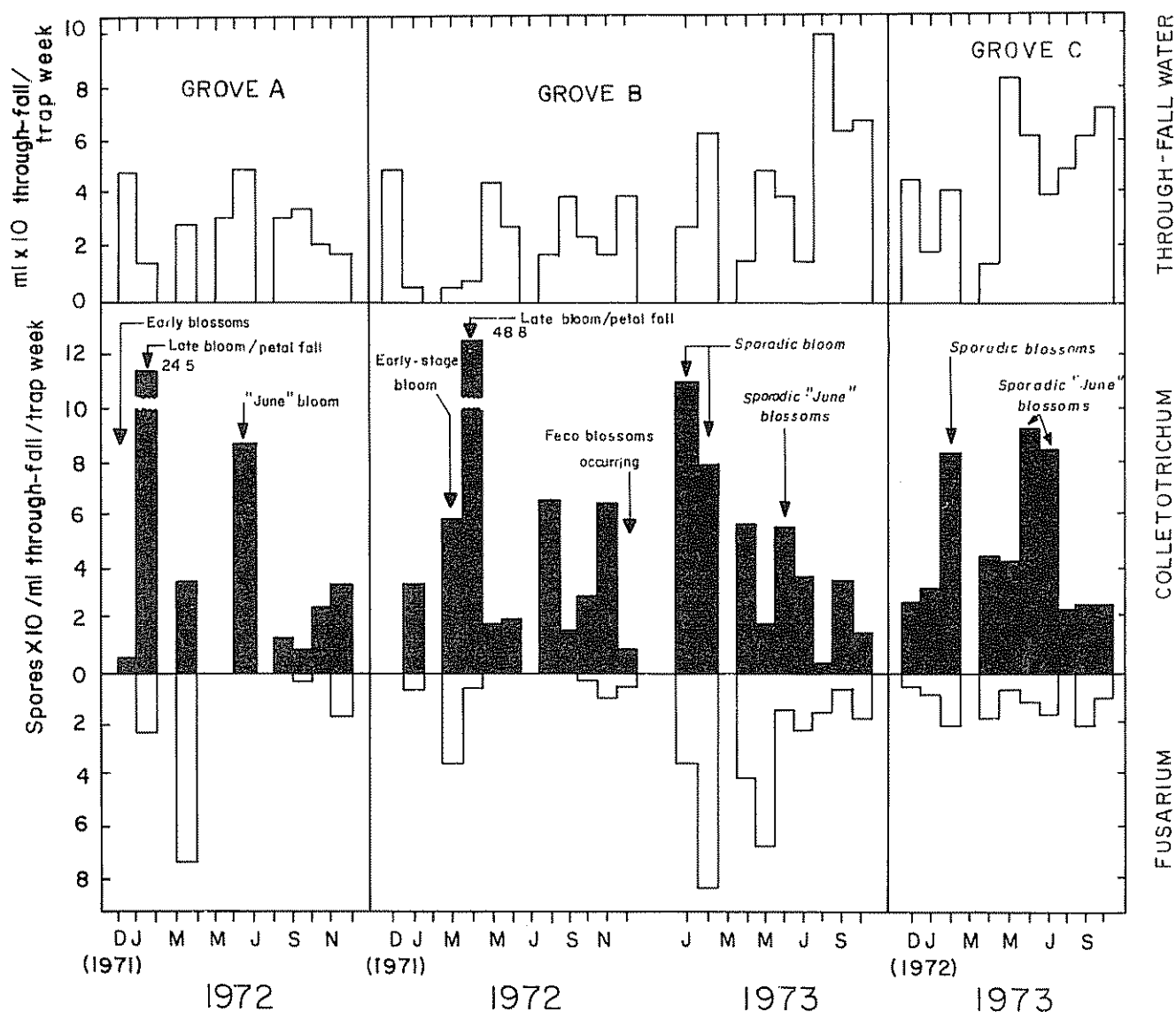


Fig. 2 Relationship between incidence of rainfall, blossoming of trees and occurrence of spores of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium* spp. in three groves of Valencia orange in Belize.

was no peak in grove B in December 1972 during which only a few, uninfected flowers were recorded on test trees, but one peak appeared with the onset of blossoming and of infections in that grove in January and February, 1973. Spores of *Fusarium* spp. were generally much fewer than those of *C. gloeosporioides* except in February 1973, when the two levels roughly coincided (grove B, 1973). Correlation between the number of *Fusarium* spores and occurrence of blossoms were not consistent.

No perithecia of *G. cingulata* were found on petals, old buttons or dead twigs during the experiment, but some were present on dead and decaying leaves on the ground. However, ascospores occurred in the traps in groves A and B during August to

November 1972, but not in 1973. The concentration of these was generally proportional to conidial concentrations and, like the latter, inversely proportional to the volume of trapped water (Table 1).

Comparison of rainfall figures for Stann Creek Valley, Cayo and Corozal Districts (Table 2) reveals that rainfall in Stann Creek is much higher than Cayo and Corozal, particularly the latter. This difference in levels of rainfall was found to be reflected in the levels of postbloom fruit drop incidence in the respective districts; whereas the disease was serious in Stann Creek, it was generally of low incidence or moderate severity in Cayo and was not observed in Corozal District. There was no relationship between temperature differences and disease levels.

Table 1. Occurrence of conidia of *Colletotrichum gloeosporioides* and ascospores of *Glomerella cingulata* in rain water from orange trees in two groves in Stann Creek Valley, Belize, in relation to rainfall (1972).

Month	GROVE A			GROVE B		
	Vol. rain water collected (mls)	No. of conidia /ml	No. of ascospores/ml	Vol. rain water collected (mls)	No. of conidia /ml	No. of ascospores/ml
16 August	500	0	0	100	1 226	549
4 September	465	0	0	373	136	136
19 September	270	181	45	425	90	45
4 October	100	407	181	165	542	361
19 October	350	32	32	325	64	0
10 November	100	1 903	0	298	65	97

Table 2. Comparative rainfall (1959 - 70) in three districts of Belize, differing in incidence of postbloom fruit drop disease of citrus.

Month	Stann Creek District (High incidence) mm	Cayo District (Moderate incidence) mm	Corozal District (No disease) mm
January	165	117	75
February	86	40	31
March	86	61	21
April	94	68	38
May	152	60	120
June	310	241	193
July	312	146	190
August	295	178	149
September	295	189	241
October	239	141	135
November	219	164	90
December	157	95	60
Total	2 410	1 600	1 343

Discussion

Although field examinations of citrus trees during the experiment failed to reveal the presence of perithecia, the occurrence of ascospores in run-off water shows that they do occur on the trees. The erratic appearance of the ascospores, however, limits their importance as source of primary inoculum for blossom infection; it is suggested that conidia, which occur in fair numbers for most of the year, play an important part in this event. Denham and Waller (1) suggest that these conidia are produced by a phyllophane, low-pathogenic strain of *C. gloeosporioides*. Once infection sets in, there is a rapid build-up of inoculum originating from acervuli on infected flowers and disease spread is maintained by these

Dispersal of spores is facilitated by rain splashes and air currents, and probably also in water droplets

from heavy dew (which frequently occurs during the main blossoming season, particularly in groves situated in depressions, and sheltered by wooden hills - conditions which favour high humidity). Dissemination of spores within and between trees may be assisted by insects; since the mature crop is usually harvested during the blossoming season of the succeeding main crop, pickers may carry masses of conidia on their bodies and ladders, particularly when trees are wet.

There was evidence of dilution of spores by increasing amounts of rainfall as observed by Waller (6), in the case of *Colletotrichum coffeanum* Noack on *Coffea arabica* L.

Although it has been noted that areas receiving highest rainfall suffer proportionately higher incidence of disease, the critical rainfall influencing

disease severity in the main bloom occurs around the driest portion of the "dry season" when sufficient dispersal, but little washing-off of spores, results

Apart from the important effect of dilution of inoculum by large amounts of through-fall, the low level of disease observed during the warm, high-rainfall period of June to September probably results from (a) the ability of the fungus to germinate well at lower rather than at higher temperatures (4) and (b) the longer duration of condensation forming on flowers in the cooler nights of January to March. The areas of higher rainfall lie mainly towards the wooded, hilly western portion of the citrus belt; besides the higher humidity, the occurrence also of higher rainfall in such areas (compared with areas closer to the sea) during the cool dry season, provide adequate facilities for spore dispersal and higher disease incidence.

Infection of trees spreads faster downwards and horizontally than upwards – a pattern consistent with spore dispersal by rain splashes and dew drops; it may spread from a single median branch to severely effect the entire tree within the brief period of one blossoming season (3–4 weeks). From such an infected tree, disease may spread for a distance of five trees along a row (7.6 m tree spacing) in the direction of the prevailing wind, and two trees in the opposite direction; no infection was observed beyond one parallel row (9.1 m apart) on either side of such infected trees. Such rapid spread is consistent with wind-assisted spore dispersal and the involvement of pickers.

Summary

Peaks in the occurrence of spores of *Colletotrichum gloeosporioides* in run-off water from citrus trees coincided with the blossoming seasons; the greatest numbers of spores occurred in the main bloom period of January to March, during which postbloom fruit drop disease is usually severe. Conidia were present in moderate numbers between blossoming seasons, but off-season blossoms were not always infected. Correlation between numbers of

Fusarium spores trapped and the occurrence of blossoms was not so consistent as in the case of *Colletotrichum* spores.

Perithecia of *Gomerella cingulata* often occurred on rotting citrus leaves on the ground, but few ascospores were found in run-off water; primary infection of blossoms is attributed mainly to conidia of *C. gloeosporioides* from off-season blossoms, but conidia produced by phylloplane *Colletotrichum* inhabitants may also be involved.

Literature cited

- 1 DENHAM, T. G. and WALLER, J. M. Some epidemiological aspects of postbloom fruit drop disease (*Colletotrichum gloeosporioides*) in citrus. *Annals of Applied Biology* 98:65-77 1981.
- 2 FAGAN, H. J. Premature fruit drop disease of citrus in British Honduras. *Citrus Research Bulletin* No. 18, University of the West Indies 1971 8 p.
- 3 FAGAN, H. J. Plant pathology and nematology in British Honduras, January 1970 to June 1972. *Citrus Research Report*, University of the West Indies, Stann Creek, Belize 1972 16 p.
- 4 FAGAN, H. J. Postbloom fruit drop, a new disease of citrus associated with a form of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Annals of Applied Biology* 91:13-20 1979.
- 5 FAGAN, H. J. Strains of *Colletotrichum gloeosporioides* on citrus in Belize. *Transactions of the British Mycological Society* 74(3):643-644 1980.
- 6 WALLER, J. M. Waterborne spore dispersal in coffee berry disease and its relation to control. *Annals of Applied Biology* 71:1-18 1972.

Reseña de libros

BORNEMISZA, E. Introducción a la química de suelos. Washington, D. C.; Secretaría Gral de la OEA. Programa Reg. de Desarrollo Científico y Tecnológico. Serie de Química, Monografía No. 25. 1982. 69 p.

Este trabajo constituye una contribución más a la colección de monografías científicas que sobre temas de física, química, biología y matemática edita el Departamento de Asuntos Científicos y Tecnológicos de la Secretaría General de la OEA, destinada a profesores y alumnos de ciencias de los primeros años de la Universidad.

Resumir en 69 páginas los aspectos más importantes de la química de suelos es una tarea muy difícil. Sin embargo, esta obra constituye una contribución bastante completa y fundamentalmente comprensible. Al final de cada capítulo se ofrece una bibliografía actualizada que permite profundizar cada tema.

El capítulo 1 referido a los componentes inorgánicos del suelo resulta algo complejo para estudiantes universitarios con conocimientos básicos de química (objetivo propuesto por el autor) en la medida que resumir en 16 páginas los minerales primarios y secundarios, así como los procesos de meteorización exige demasiada síntesis en detrimento de la comprensión. Los ejemplos ofrecidos respecto a los suelos en que se presentan los distintos minerales colaboran en parte a subsanar este problema.

El capítulo sobre materia orgánica es claro y conciso; ofrece un resumen de los principales grupos de sustancias orgánicas en el suelo, su importancia y los procesos generales de descomposición. Se destaca la importancia de los complejos organominerales y la necesidad de un estudio más exhaustivo de los mismos.

El capítulo 3 sobre los procesos de adsorción en el suelo ofrece una revisión muy completa de las teorías existentes acerca de este fenómeno y su representación matemática (isotermas de Langmuir y Freundlich; ecuación de BET). El tema del intercambio catiónico ha sido especialmente tratado, incluyendo modelos de representación, ecuaciones de equilibrio y factores que lo afectan.

En el capítulo 4 se considera el rol de los oligoelementos en el suelo (Fe, Mn, Zn, Cu, Cl, B y Mo) ofreciéndose un resumen muy completo acerca del origen de los mismos y de los factores que afectan su disponibilidad.

En general esta monografía presenta una buena introducción a la química de suelos, escrita además en un castellano claro, aspecto normalmente deficiente en las traducciones y libros sobre suelos en nuestra lengua. Resulta particularmente interesante el capítulo sobre los fenómenos de adsorción. No queda claro porque no se ha incluido un breve capítulo sobre macronutrientes, esencialmente P y N, que hubiera contribuido a ofrecer una obra aún más completa.

MARIA JULIA MAZZARINO
CATIE-TURRIALBA

Resumen

Se logró un buen control de la enfermedad con una sola aplicación de benomyl con captafol (0.78 kg a 0.99 kg: 4.5 a 6.0 l/ha de formulación) con bomba de mochila o de motor o por avión. El captafol usado por sí solo (7.7 – 11 l/ha) tuvo gran efectividad cuando se aplicó dos veces, con un intervalo de 14 días; el benomyl solamente fue efectivo después de cuatro aplicaciones (a 0.99 kg/ha) por avión, y no tuvo ningún efecto cuando se aplicó desde el suelo en la dosis de 0.78 kg/ha. El captafol tuvo un efecto residual bastante largo, siendo más efectivo en el tratamiento de la enfermedad de la caída de la fruta que el benomyl. El control de la enfermedad y la retención de la fruta mediante aplicación aérea fue comparable al resultado del método de aplicación terrestre.

Introduction

Even before the cause of postbloom fruit drop disease (*Colletotrichum gloeosporioides*) was known, there were attempts to control it by application of hormone (because it was thought the disease might be physiological) and fungicide sprays (because histological studies also suggested the involvement of fungi) (8)

In these exploratory tests, Weir and Phelps (10) considered the hormone treatment (2,4-D) at 10 ppm to be more effective in increasing fruitset than Perenox (cuprous oxide) or Maneb (dithiocarbamate) each at 2 g/l.

In subsequent studies, Fagan (2, 3) showed the involvement of a fungus in the disease, and preliminary test both *in vitro* and in the field showed a number of fungicides to be effective against the disease. Field application of the fungicides on whole trees was made by means of mistblowers. However, commercial application of fungicides by mistblowers and other ground equipment suffers limitations which

can be serious, particularly on the rough terrains of many citrus groves in Belize. The alternative method of spraying by aircraft was therefore considered.

This paper describes experiments to test the comparative efficacies of (a) ground spraying versus aerial spraying of various fungicide treatments; (b) various schedules of spraying, against postbloom fruit drop disease

Materials and methods

Fungicide application

Three fungicide trials were conducted on Valencia orange at different sites in the Stann Creek Valley, during the main blossoming season of 1972. The objectives of these trials were:

- a) to discover the minimum number of applications of various fungicides required for satisfactory disease control and improvement of fruitset;
- b) to compare the effectiveness of aerial spraying with that of ground spraying and estimate the economic feasibility of the former

Five fungicide treatments involving four chemicals were tested in the ground spraying experiments and four treatments (two chemicals) in the aerial experiment (Table 1). In the ground spraying experiment,

¹ Received for publication on August 12, 1983

* Citrus Research Station, Citrus Growers Association, Stann Creek Valley, Belize, C.A.

* Present address: Faculty of Agriculture Unit, University of the West Indies, Mona, Kingston 7, Jamaica, W.I.

Table 1. Chemicals used in aerial and ground spraying against postbloom fruit drop of sweet orange in Belize (1972).

Treatment ^a		GROUND APPLICATION	AERIAL APPLICATION
		Rate of formulation/ha	Rate of formulation/ha
I	Benomyl +	0.78 kg	0.99 kg
	Captafol	4.50 l	6.00 l
II	Benomyl +	1.55 kg	1.98 kg
	Captafol	4.50 l	6.00 l
III	Captafol	7.70 l	11.10 l
IV	Benomyl	0.78 kg	0.99 kg
V	Captan +	2.47 kg	—
	Thiabendazole	0.78 kg	—

a Spreader/sticker was used in treatments I, II & III, at the rate of 0.1% v/v; albolineum oil was used in IV and V at 5% v/v. Benomyl (Benomyl 50 w, E. I. du Pont de Nemours & Co., USA); Captafol (Difolatan 4F, Chevron Chemical Co., Ortho Division USA); Captan (Captan 50 w, Chevron Chemical Co., Ortho Division USA); Thiabendazole 60 w = Tecto 60, Merck & Co., Inc., Merck Chemical Div., USA).

treatments were applied to individual trees by means of a motorised knapsack sprayer (mitsblower), so that each tree received approximately 3.0 l of fungicide mixture, giving a spray volume of 722 l/ha (1 ha = c. 240 trees). In the aerial spraying experiment, fungicide application was by means of a fixed wing Piper Commander aircraft fitted with Tee-Jet nozzles and 46, D8 orifices. Spray volume was 112 l/ha, delivered under a pressure of 198 g/cm² and at c. 153 km/h relative ground speed. The aircraft flew as low as possible between the rows of citrus during spray delivery, the treatments being marked with flags of different designs and colours fixed at both ends of the plot (Figure 1).

The first application was sprayed when 30-50% of the trees were blossoming and less than 15% of the blossoms were at the opening stage.

Three schedules of application were used: a) single application, at the beginning of the experiment; b) two applications at intervals of 14 days and four applications at intervals of 8 days.

A split-plot design was employed in both the ground and aerial experiments. In the former, there were four replicates of three schedules, split for treatments; each plot consisted of two trees. In the aerial spraying experiment there were three replicates, and plots consisted of two rows of 25 trees; the central 10 of the 50 trees in each plot were used for

disease assessment. Guard rows provided distances between plots of approximately 27.5-36.5 m.

Two-four branches/tree were selected (depending on abundance of flowers) and 1 500-1 600 blossoms/plot were tagged, the blossoms being well distributed on the constituent trees. As a rule, branches towards the tops of the trees were not selected because fruit-set was generally better (due to lighter infection) than on lower branches. The number of blossoms (flower buds) on the tagged branches were recorded at the beginning of the spray schedules and the numbers of healthy fruitlets and disease buttons resulting from these flowers were recorded between 4 and 6 wks after application of the final spray. At this stage, healthy fruitlets are approximately 1.5-2.7 cm diameter and the majority of affected fruitlets have abscised leaving the typical buttons on the branches; affected fruitlets which have not yet abscised are usually discoloured and always noticeably smaller than healthy fruitlets. These abnormal fruitlets are recorded as buttons since they either drop shortly or remain undeveloped.

Persistence of fungicides: Samples were taken in a low volume spray experiment (122 l/ha), in which the fungicide treatments were: captafol 80W, 0.84 kg/ha; benomyl, 0.45 kg/ha and thiabendazole (Tecto 60), 0.45 kg/ha, the last two figures being an average of two higher and two lower doses of those fungicides.

Samples were also taken from a separate experiment where the above fungicides were applied by high volume sprayer at rates approximately twice those used in the low volume spraying. The high volume spraying was conducted on oranges in a high rainfall area and the low volume in an area experiencing moderate to low rainfall. The samples

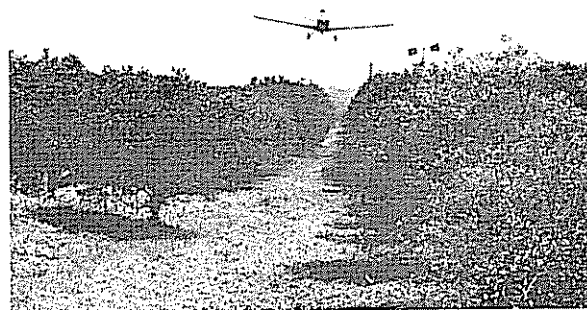


Fig. 1. Spraying of citrus plots by fixed-wing aircraft, against postbloom fruit drop disease: aircraft flying low between rows of trees.

consisted of 15-20 flower buds and a similar number of young fruitlets/treatment, selected into clean plastic bags. The flower buds were picked just prior to the stage of budburst and the fruitlets, within 2 wk of petal fall. Samples were taken at 3, 8, 14, 21 and 28 days after final spray application.

Portions of the flower buds and fruitlets were plated out on potato dextrose agar previously seeded with conidia of *Colletotrichum gloeosporioides*, and incubated at ambient temperature. Plates were examined after 3-6 days for zones of inhibition around the portions; inhibition was rated as follows: no inhibition, (-); fairly weak inhibition - a narrow zone \approx 0.5 - 2.0 mm wide, (\pm); strongly positive inhibition - zones \geq 4.5 mm - 10 mm wide, (+ +)

Results

Effect of fungicides and methods of application

Preliminary experiments. Preliminary fungicide tests on infected branches by Weir and Phelps (10) produced little evidence of disease control. In subsequent *in vitro* tests with three of the chemicals used, namely maneb (manganese ethylene-bis-dithiocarbamate), Perenox (cuprous oxide), and 2, 4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) against the associated form of *Colletotrichum gloeosporioides*, inhibition of fungal growth was weak (maneb) or lacking (Perenox and 2, 4-D). Perenox at 17.5 and 35.0 g/l spectacularly enhanced sporulation in the seeded plates (Figure 2, A2). In similar culture tests using another copper-containing fungicide - Cheshunt Compound (a mixture of 2% copper sulphate and 11% ammonium carbonate) - sporulation of *C. gloeosporioides* was also stimulated (Figure 2, A3); like Perenox, Cheshunt Compound was ineffective against postbloom fruit drop disease.

In other fungicide tests using whole flowering trees sprayed by mistblowers, various levels of disease control were obtained with different chemicals (2). In two such tests, it was found that albolinum oil (5%) in treatments containing captafol (1.25 - 4.0 g/l) or captan (2.5 - 4.0 g/l) produced phytotoxic effects; this was particularly evident in captafol. On foliage, symptoms varied from moderate crinkling of young leaves in the mildest cases, to gross deformity of young and maturing leaves; on flowers they varied from slight deformity to gross distortion, extensive browning and premature opening of flower buds; brown patches formed on exposed areas of young fruits, and severe russetting occurred on maturing and ripening fruits. Phytotoxic effects did not occur to any extent in the present experiments in which oil was omitted from treatments containing captafol.

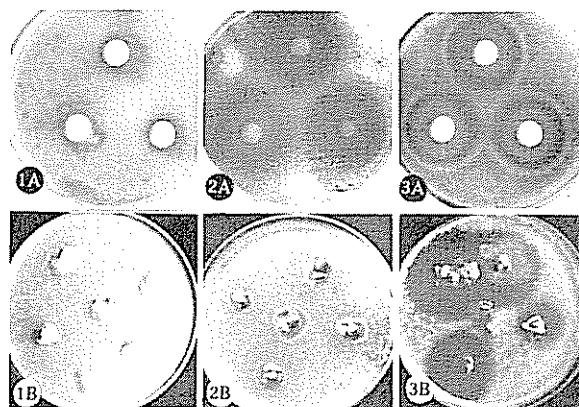


Fig. 2(A) Effect of copper fungicides on sporulation of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus inflorescence: (A1) control; (A2) enhanced sporulation by Perenox in older cultures; (A3) zonate growth preceding enhancement of sporulation by Cheshunt compound, in younger cultures.

Fig. 2(B) Relative persistences of benomyl and captafol on Valencia oranges fruitlets and flowers, eight days after spraying of trees: (B1) absence of inhibition of *C. gloeosporioides* by benomyl in petals; (B2) weak inhibition by benomyl, in fruitlets; (B3) strong inhibition by captafol, in fruitlets.

Present experiments: In so far as the experiments were designed to test the comparative efficacies of applying treatments by air and by ground equipment, it was considered desirable to present the relevant data in one table. Since the ground trials involved two separate sites, it was also considered more convenient to combine the results of the two sites; the possibility of being able to do so on statistical principles was first investigated. It was found that although fruit-set was higher (and buttons were lower) at one ground site than the other, there was a general evidence (from computer analysis) of a similarity in response of schedules, treatments (Table 2) and treatments v schedules at both ground sites; it was thus possible to combine the data from the two sites. In addition, the control means for each site were pooled in the comparison of results.

Disease control may be assessed by two, complementary parameters: (1) improvement of fruitset and (2) reduction of buttons. For practical purposes, emphasis is placed on the more important parameter of fruitset.

Effect of ground-applied treatments: In general, there was a very highly significant difference in fruitset ($P = 0.001$) between treated and untreated plots. The best treatment was the mixture of captafol with the lower concentration of benomyl (Treatment 1, Tables 2 and 3); this produced a highly significant ($P = 0.01$) improvement in fruitset at all schedules:

Table 2. Effect of fungicides and frequencies of application by ground equipment, on fruitset of Valencia orange at two sites affected by postbloom fruit drop disease in Belize (1972).

Treatment ^a	FRUIT PER THOUSAND BLOSSOMS					
	One Application		Two Applications		Four Applications	
	Site 1	Site 2	Site 1	Site 2	Site 1	Site 2
I Benomyl (L)/Captafol	66.6	158.8**	91.3	136.9*	134.8**	101.5**
II Benomyl (H)/Captafol	41.5	69.5	73.9	161.7**	112.9**	141.8**
III Captafol (H)	54.7	54.2	105.9	129.0	106.8	108.1**
IV Benomyl (L)	37.8	70.8	47.6	93.7	67.3	93.6*
V Thiabendazole/Captan	18.4	51.3	33.7	90.4	29.9	76.6
VI Control	40.7	70.4	74.8	74.3	29.6	14.9
			Site 1 (Canada Hill)		Site 2 (False Creek)	
L.S.D. Treatments:	P = 0.05		48.4		63.8	
	0.01		64.7		85.3	
L.S.D. Schedules:	P = 0.05		50.9		67.4	
	0.01		70.0		92.7	

*, ** Treatments within schedule are significantly different from control at $P = 0.05$ and 0.01 respectively.

^a Benomyl (L), 0.78 kg/ha; Benomyl (H), 1.55 kg/ha; Captafol, 4.5 l/ha; Captafol (H), 7.7 l/ha; Thiabendazole, 0.78 kg/ha; Captan, 2.47 kg/ha

122% increase in Schedule A, 124% in Schedule B, and 133% in Schedule C (Table 3). The higher concentration of benomyl with captafol (Treatment II) was highly effective ($P = 0.01$) at two and four applications (132% and 152% increase in fruitset respectively - Table 3). A single application of captafol alone was not effective (8% increase in fruitset), but a highly significant ($P = 0.01$) improvement of fruitset (131% increase) was obtained with two applications. Benomyl alone was not significantly effective at any of the schedules when the results of the two sites were combined (Table 3); the thiabendazole/captan treatment also was generally ineffective.

Effect of aerial treatments: In this trial, as in the ground trials, there was a very highly significant ($P = 0.001$) improvement of fruitset in treated plots compared with control. The best treatment on average was the mixture of captafol with the higher concentration of benomyl (Treatment II) which produced a highly significant ($P = 0.01$) increase in fruitset (107%) using a single application, and a very highly significant ($P = 0.001$) increase with two and four applications (194% & 189% respectively; Table 3). At the lower concentration of benomyl-with-captafol a highly significant ($P = 0.01$) increase in fruitset (119%) was obtained with a single application (Table 3, Schedule A), and a very highly significant increase (139%), in Schedule C. One application of captafol alone produced a significant

increase in fruitset (96%), and a very highly significant ($P = 0.001$) increase was achieved with two and four applications (156% & 167%, respectively). Benomyl applied alone was the least effective of the treatments applied by air (Table 3). Only after four applications did a highly significant ($P = 0.01$) increase of fruitset (125%) result.

In the very effective treatments, there was generally no significant difference between schedules. In Treatment II (Table 3), there was a significant difference only between the single application and the other schedules. In the benomyl treatment (IV) there was a significant ($P = 0.05$) difference between the results of Schedule C, and those of A and B, which did not differ significantly.

Comparison of methods of spraying: Except for Treatment I at all applications and Treatment IV at two applications, aerial application appeared more effective than ground application. This is illustrated particularly in the increase of fruitset and reductions of buttons in the following cases (Table 3): Treatments II and III in Schedule A, Treatment II in Schedule B; Treatment III and IV in Schedule C. The difference was greater at a single application than after repeated applications.

Residual activity of fungicides: Benomyl had a very low residual activity in developing citrus inflores-

Table 3. Comparative effects of fungicides, frequencies of application by ground and aerial spraying, on postbloom fruit drop disease of Valencia orange in Belize (1972).

Treatment ^a	GROUND APPLICATION ^b			AERIAL APPLICATION ^c		
	Fruitset/10 ³ blossoms	Buttons/10 ³ blossoms	% Increased in fruitset over mean controls (50.8) ^d	Fruitset/10 ³ blossoms	Buttons/10 ³ blossoms	% Increased in fruitset over mean controls (28.9) ^d
A. ONE APPLICATION						
I Benomyl (L)/Captafol	112.7**	283.2*	121.8	63.3**	260.6*	119.0
II Benomyl (H)/Captafol	55.5	461.3	9.2	59.9**	196.1**	107.2
III Captafol (H)	54.8	546.7	8.2	56.7*	257.4*	96.1
IV Benomyl (L)	54.3	424.5	6.9	32.2	395.0	11.4
V Thiabendazole/Captan	34.9	489.2	31.3	—	—	—
VI Control	55.6	414.7	—	24.7	433.2	—
B. TWO APPLICATIONS						
I Benomyl (L)/Captafol	114.0**	362.3	124.4	55.4*	208.6	91.6
II Benomyl (H)/Captafol	117.8**	212.5**	131.6	84.9**	151.7***	193.7
III Captafol (H)	117.5**	370.3	131.2	74.0***	168.0***	156.0
IV Benomyl (L)	70.7	392.2	39.1	39.3	346.0	35.9
V Thiabendazole/Captan	62.0	405.0	22.0	—	—	—
VI Control	74.6	431.3	—	33.7	347.0	—
C. FOUR APPLICATIONS						
I Benomyl (L)/Captafol	118.2**	117.5***	132.6	69.0***	107.4***	138.7
II Benomyl (H)	127.8**	127.3***	151.5	83.4***	54.5***	188.5
III Captafol (H)	107.5*	269.3**	111.6	76.8***	136.1***	165.7
IV Benomyl (L)	80.5	223.6**	58.4	65.0**	211.5**	124.9
V Thiabendazole	53.3	367.0	4.9	—	—	—
VI Control	22.2	538.4	—	28.2	301.2	—

L.S.D.
(Aerial trial) Treatments: P = 0.05, 21.1 (fruitset); 99.8 (buttons)
Schedules: P = 0.05, 23.9 (fruitset); 118.5 (buttons)

*, **, ***; P = 0.05, 0.01, and 0.001 respectively

a Benomyl (L), 0.78 kg/ha; Benomyl (H), 1.55 kg/ha; Captafol, 4.5 l/ha
Captafol (H), 7.7 l/ha; Thiabendazole, 0.78 kg/ha; Captan, 2.47 kg/ha

b Means of two sites (see Table (2), each approx. 5 ha

c One site, approx. 61 ha

d Percentages are primarily for ease of reference, rather than for further direct statistical comparisons

cences, in tests against *Collectrotrichum gloeosporioides* in culture (Figure 2 B1, B2). Even at eight days after its application to the trees, there was no indication of its presence on older flower buds, and its presence was only weakly indicated in fruitlets (Table 4). In contrast, captafol had long and effective residual activity both on flower buds and on fruitlets (Figure 2 B3); this activity persisted for 3 wk on flowers and 4 wk on fruitlets.

Discussion

The high and consistent effectiveness of a single application of benomyl (L)/captafol (Treatment I, Tables 2 and 3) in the ground spraying method, compared with the other treatments containing benomyl or captafol, was an unexpected occurrence. The fact that this trend was repeated (albeit to a lesser extent) in the aerial spraying experiment

Table 4. Comparative antifungal activities of benomyl, thiabendazole and captafol residues in citrus blossoms and fruitlets^a against spores of *Colletotrichum gloeosporioides*

Days after final sprays	LOW VOLUME						HIGH VOLUME					
	Benomyl		Captafol		Thiabendazole		Benomyl		Captafol		Thiabendazole	
	Petals	Fruitlets	Petals	Fruitlets	Petals	Fruitlets	Petals	Fruitlets	Petals	Fruitlets	Petals	Fruitlets
3	-	±	±	+	-	-	-	+	++	++	-	-
8	-	-	-	+	-	-	-	+	++	++	-	-
14	-	-	-	+	-	-	-	+	++	++	-	-
21	-	-	-	+	-	-	-	+	++	++	-	-
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

a: From one experimental site

- No inhibition

± Activity fairly weak

+

++ Strongly positive inhibition

indicates that the result is not a fortuitous one; it suggests a synergistic action between the two chemicals at that concentration. The outstanding performance of that treatment in the ground trials (particularly in site 2), also suggests an interplay between synergistic action and correct timing of application. Such timing would prevent the usually rapid build-up of inoculum which accompanies the progress of the blossoming season.

Although benomyl failed to significantly improve fruitset after four applications by ground, it significantly ($P = 0.05$) reduced the number of buttons formed (Table 3); this reduction is attributed to the therapeutic effect of the fungicide. It apparently fails to prevent fruitlet abscission once the early stages of blossom infection have passed, but arrests fungal growth and/or production of the substance(s) promoting the persistence and swelling of buttons (3).

The results of these trials suggest that, except for benomyl applied alone (by air), four applications of the effective treatments were excessive and at most, two applications seemed quite adequate; although a single application of some treatments gave satisfactory disease control, the precise timing on which such successes depended may be safely (and economically) avoided in practice by the use of two applications. The results have indicated that as single chemicals, captafol is more effective against postbloom fruit drop disease than benomyl. This greater effectiveness appears to lie in the demonstrated persistence of the former on the citrus trees, a factor also reported by Whiteside (11) for citrus and Gibbs (5) for coffee. This persistence is considered to be the main contributory factor in the high

effectiveness of benomyl/captafol mixtures at the lower frequencies of application. Similarly, the non-persistence of benomyl on the citrus tissues explains its ineffectiveness at such frequencies.

Although the concentrations of chemicals were higher in the aerial than in the ground spraying experiments, the often better results of the former method are not explained by this fact. The actual amounts of fungicide deposited on individual trees were considered comparable, allowing for the open spaces within plots sprayed by the aerial method. The observed higher effectiveness of aerial spraying is believed to result from the more efficient distribution of the fungicides. This difference between methods was reduced as more material was deposited on the trees in two or more applications. However, in terms of relative effectiveness of method and speed of operation, the use of aircraft should be the obvious choice for fungicide application against postbloom fruit drop disease. The cost of this method was found to be moderately higher (by approximately 1.96 ha in 1973) than for ground application – a price which was justified in the valuable time gained covering citrus areas or difficult terrain at the critical time.

The expected effect of the various schedules is that increased disease control (and fruitset) would be obtained with repetition of treatment applications. While this was so in most cases, there were instances where a single application was more effective than two or four (Table 3, Treatment I, Aerial; Table 2, Treatment I), and two applications were more effective than four (Table 2, Treatment III, Site 2; Table 3, Treatment III, Ground). Although these differences were not significant statistically, they were nevertheless surprising; the reasons for such results are not clear.

The existence (and availability) of two effective chemicals for the control of postbloom fruit drop disease is an advantage, in that it reduces the probability of early development of fungal resistance, such as might be produced by the continual use of a single fungicide. Nonetheless, occasional monitoring of the mycological effects of these chemicals on the microflora of citrus is desirable.

Nutman and Roberts (7) reported that certain fungicides, including copper (Perenox), stimulated both the growth of an unidentified fungus on coffee and perithecium production of a form of *Colletotrichum coffeanum* on that host. Gibbs (6) reported that copper (Perenox) stimulated sporulation of the CBD strain of *C. coffeanum* and of *Phoma* sp. on coffee and suggested that "early-season sprays of copper, formerly used to control CBD, may have contributed to an increase in disease hazards by affecting the primary level of the pathogen." The inefficacies of copper sprays indicated by Firman (4) may be explained by these effects of copper on some microflora of the coffee tree: the results of seeded-plate tests on the *C. gloeosporioides* associated with postbloom fruit drop of citrus confirms this stimulatory effect of copper on *Colletotrichum*.

During a recent visit to Belize (1981-1982) it was found that despite the promising results of the above experiments, there was no established programme for spraying against postbloom fruit drop disease. Two main reasons for this might be (a) the low effectiveness of benomyl and its relatively high cost were economically unattractive to growers; (b) although captafol proved effective and persistent, its demonstrated toxicity to fish in streams close to citrus orchards sprayed by a large grower probably posed an ethical problem to the rural community. The development of a control programme against the disease was desirable, but efforts towards this end (1) did not appear to have materialized.

I thank the Citrus Company of Belize for use of the area at Pomona for the aerial trial, Crop Culture Limited whose aircraft did the spraying, Salada Belize Limited and Mr D Longford for use of the False Creek and Canada Hill sites respectively for the ground trials, Mr Roy Locke for assistance in preliminary tests, Mr H Aldana for field assistance, the Citrus Growers Association of Belize in whose employment most of the work was conducted and for their permission to publish the results; Mrs J Sanchez, C.A.R.D.I., Trinidad, for statistical analysis of the results of the fungicide experiments.

Summary

Good disease control was obtained with a single application of a mixture of benomyl with captafol (0.78 + 0.99 kg: 4.5 + 6.0 l/ha. of formulation), applied either by ground or by air. Captafol alone (7.7 + 11.1 l/ha) was highly effective when applied twice at intervals of 14 days, but benomyl alone was significantly effective only after four applications (at 0.99 kg/ha) by air; it was not significantly effective at this schedule when applied by ground at 0.78 kg/ha.

Captafol had long residual activity on citrus trees, unlike benomyl, thus resulting in its greater effectiveness against postbloom fruit drop disease.

Disease control and increase of fruitset obtained by aerial spraying were at the least comparable to those of ground spraying.

Literature cited

- 1 DENHAM, T. G. Citrus production and premature fruit drop disease in Belize. PANS 25(1):30-36 1979.
- 2 FAGAN, H. J. Premature fruit drop disease of citrus in British Honduras. Citrus Research Bulletin No. 18, University of the West Indies 1971. 8 p.
- 3 FAGAN, H. J. Postbloom fruit drop, a new disease of citrus associated with form of *Colletotrichum gloeosporioides*. Annals of Applied Biology 91:13-20 1979.
- 4 FIRMAN, I. D. A review of leaf rust and coffee berry disease control in Kenya. Tropical Agriculture 42:111-119 1965.
- 5 GIBBS, J. N. Some factors influencing the performance of spray programmes for the control of coffee berry disease. Annals of Applied Biology 67:343-356 1971.
- 6 GIBBS, J. N. Effects of fungicides on the populations of *Colletotrichum* and other fungi in bark of coffee. Annals of Applied Biology 70:35-47 1972.
- 7 NUTMAN, F. J. and ROBERTS, F. M. The stimulating effect of some fungicides of *Glomerella cingulata* in relation to the control of coffee berry disease. Annals of Applied Biology 64:335-344 1969.

- 8 PHELPS, R. H. Premature fruit drop British Honduras. In Citrus Research (Report of the Citrus Research Unit, University of the West Indies), 1968 p. 71
- 9 WALLER, J. M. Water-borne spore dispersal in coffee berry disease and its relation to control. Annals of Applied Biology 71:1-18 1972.
- 10 WEIR, C. C. and PHELPS, R. H. Premature fruit drop in British Honduras. In Citrus Research (Report of the Citrus Research Unit, University of the West Indies) 1968. pp 40-41
- 11 WHITESIDE, J. O. Sites of action of fungicides in the control of citrus melanose. Phytopathology 67:1 067-1 072. 1977.

Reseña de libros

LABAN, P. Proceedings of the workshop on land evaluation for forestry. The Netherlands ILRI Public No. 28. 1981. 355 p.

El libro incluye los trabajos presentados en un Taller de Trabajo Sobre Evaluación de Tierras con Fines Forestales, auspiciada por el International Union of Forestry Research Organization (IUFRO) y el grupo de Trabajo en Evaluación de Tierras de la Sociedad Internacional de Ciencia del Suelo (ISSS). La reunión se llevó a cabo en Holanda en noviembre de 1980.

Los 17 trabajos presentados se agrupan en dos secciones; la primera resume la situación actual con sesiones sobre 1) Dinámica de los sistemas forestales, 2) Técnicas de reconocimiento y clasificación de tierras y 3) Clasificación de sitios. La segunda sesión trata sobre "un enfoque integral de clasificación de tierras" e incluye sesiones sobre: 1) Conceptos y procedimientos, 2) Calidad de la tierra y sus relaciones con los requerimientos de su uso y 3) Otros aspectos de relación y aplicación de sistemas de clasificación.

Comentar cada artículo sería una labor importante pero que caería en la situación de evaluar el bosque

como la suma de sus partes en vez del conjunto. Quizás, entonces, sea mejor resumir los aspectos más sobresalientes del texto. En primer lugar, debe mencionarse que la clasificación de tierras para uso forestal aún permanece en un nivel cualitativo; no se llega a integrar un sistema numérico quizá por la discrepancia de las escuelas de pensamiento representadas en la reunión. Vale la pena enfatizar en un segundo aspecto, los autores están concientes de la necesidad de lograr el cometido del primer punto y presentan numerosa información que deberá ser evaluada posteriormente con este fin.

En el texto se discuten varios sistemas de explotación forestal, lo que hace que los requisitos de las tierras, para que se ajusten a las diferentes situaciones, sean muy variadas. Es mi opinión que ni aún con la propuesta de Bailey para los Estados Unidos (Enfoque integral de clasificación de tierras como ecosistemas) se logra llenar el contenido a nivel mundial.

En el contenido del libro se observan trabajos descriptivos, críticos y de resumen. La obra representa una buena recopilación de la información disponible hasta que debe formar parte de las bibliotecas de escuelas forestales y de especialistas en planificación y clasificación de recursos físicos.

ALFREDO ALVARADO
UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SAN JOSE, COSTA RICA

F. BERTSCH*
A. CORDERO**
A. ALVARADO***

Summary

The fertility of nine Typic Dystrandepts of Costa Rica was studied under laboratory and greenhouse conditions. Chemical soil analysis, retention curves for K, Mg, Mn, Zn, Cu, P, B and S, foliar analysis from sorghum plants grown on unfertilized soils, and a greenhouse test with the missing or additive element technique with sorghum in a liter soil pot, were realized. The methods described by Díaz-Romeu & Hunter for a qualitative soil fertility diagnosis were used.

The studied cations present similar nutritional characteristics in the nine Typic Dystrandepts. As shown by the greenhouse data, K was the most limiting cation after the P deficiency was corrected. It was observed that soil pH and soil bases level are useful potential fertility indexes for volcanic soils, because Ca and Mg initial contents determine natural fertility. In these soils, exchangeable Al was not found important. No Fe problems were observed and the Mn and Zn problems found by soil analysis were not reflected in the greenhouse data. Only some soils from the Cordillera de Guanacaste respond positively to Cu application.

Ca concentration in Typic Dystrandepts of Costa Rica varies, with a 90% statistic probability, from 3.2 to 11.7 meq/100 ml, Mg, from 0.9 to 3.2 meq/100 ml, K, from 0.03 to 0.83 meq/100 ml, Fe, from 27 to 104 µg/ml, Mn from traces to 60 µg/ml, Zn, from 1.4 to 7.0 µg/ml and Cu, from traces to 23 µg/ml. Soil pH in water varies between 5.6 and 6.7 and in KCl between 4.9 and 5.6. Exchangeable acidity varies from 0.07 to 0.12 meq/100 ml.

Ca concentration in foliar tissue of sorghum grown in greenhouse on these soils varies from 0.30 to 0.85%, Mg, from 0.20 to 0.59%, K, from 0.68 to 4.01%, Fe, from 29 to 167 ppm, Mn, from traces to 237 ppm, Zn from 7 to 59 ppm, and Cu, from 8 to 26 ppm.

¹ Recibido para publicación el 30 de marzo de 1984. Este trabajo constituye parte de la tesis de maestría de la primera autora en el Sistema de Estudios de Posgrado UCR-CATIE, y recibió apoyo financiero de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica a través del proyecto número 02-07-06-67, "La fertilidad de las asociaciones de suelos de origen volcánico".

Los autores le agradecen al Dr. Elemer Bornemisza su colaboración en la revisión y comentarios al presente artículo, y a la Unidad de Suelos del MAG las facilidades brindadas para efectuar los análisis químicos.

* Universidad de Costa Rica, Turrialba, Costa Rica. Dirección permanente: Apartado 914, San José, Costa Rica

** Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica

*** Laboratorio de Suelos, Escuela de Ingeniería, Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica

Introducción

El uso agropecuario de los andepts, "andosoles" o suelos derivados de cenizas volcánicas se extiende a nivel mundial en áreas pequeñas principalmente ubicadas a lo largo del Anillo de Fuego o Faja Circumpacífica. En términos porcentuales estos suelos son poco abundantes; en Costa Rica existen aproximadamente 150.000 ha (3% del área total) bajo uso intensivo en café, hortalizas, caña de azúcar y ganado de leche.

Debido a la gran actividad que soportan, la información que existe sobre el comportamiento nutricional de andosoles en diferentes partes del mundo (Japón, Hawaii, América Latina) es abundante, aunque poco concluyente. El objetivo de este trabajo es concretar, a partir de un grupo de nueve suelos clasificados como Typic Dystrandept y usando métodos de laboratorio e invernadero, las características nutricionales de los suelos de este tipo ubicados fuera del Valle Central de Costa Rica.

En la primera parte de este estudio se presenta la metodología aplicada para todo el trabajo, y el comportamiento nutricional de la acidez, las bases (Ca, Mg, K) y los elementos menores catiónicos (Fe, Mn, Zn, Cu). La segunda parte comprende el comportamiento de los nutrientes aniónicos (N, P, B, S, Mo), la materia orgánica y la textura.

Materiales y métodos

Los suelos en estudio, previamente clasificados por Cervantes (2), Méndez (9) y López (7) como Typic Dystrandept, provienen de los puntos indicados en la Figura 1. Las muestras se tomaron a una profundidad de 0-20 cm, se secaron al aire, trituraron y pasaron por un tamiz de 2 mm. La evaluación de la fertilidad se hizo a través de los siguientes procedimientos:

- 1 Análisis químico de los suelos en el laboratorio
- 2 Estudios de retención de nutrientes en el laboratorio
- 3 Análisis foliar de plantas de sorgo desarrolladas en invernadero sobre los suelos sin fertilizar
- 4 Prueba biológica en invernadero mediante la técnica del elemento faltante o aditivo.

En general se siguió la metodología descrita por Diaz-Romeu y Hunter (3) para diagnósticos cualitativos de fertilidad de suelos.

Análisis químico de suelos

El pH se determinó potenciométricamente en H₂O y en KCl 1N, con una relación de 10 ml de suelo a 25 ml de solución.

La extracción de la acidez intercambiable ($Al^{+3} + H^+$ intercambiables), del Ca y del Mg se realizó con KCl 1N en una relación 1:10. Para determinar la acidez, se tituló con NaOH 0.01 N en presencia de fenoftaleína. Las concentraciones de Ca y Mg se determinaron en un espectrofotómetro de absorción atómica.

Para el K, Fe, Mn, Zn, Cu y P, se efectuó una extracción de 1:10 con solución Olsen modificada (NaHCO₃ 0.5 N, EDTA 0.01 M). Las concentraciones de K, Fe, Mn, Zn y Cu se determinaron en un espectrofotómetro de absorción atómica. Para la determinación colorimétrica de P se siguió el procedimiento del azul de molibdeno, usando soluciones diluidas de cloruro estañoso y molibdato de amonio.

El B y el S se extrajeron con una solución de CaH₄(PO₄)₂ en una proporción de 10 ml de suelo a 25 ml de solución extractora. El B se determinó por colorimetría usando curcúmina. Para el S se usó el procedimiento turbidimétrico a base de BaCl₂, con floculante PVP (polyvinilpyrrolidone).



Fig. 1. Ubicación geográfica de los nueve Typic Dystrandept estudiados. 1. Dos Ríos, Upala, Alajuela. 2. Santa María, Bagaces, Guanacaste. 3. Bijagua, Upala, Alajuela. 4. La Laguna, Tilarán, Guanacaste. 5. Monteverde, Puntarenas. 6. Zarcero, Alfaro Ruiz, Alajuela. 7. Sabalito, Coto Brus, Puntarenas. 8. Agua Buena, Coto Brus, Puntarenas. 9. Agropecuario, Corredores, Puntarenas.

El porcentaje de materia orgánica se determinó por el método de combustión húmeda de Walkey y Black, modificado por Saiz del Río y Bornemisza. El análisis granulométrico para caracterización de texturas se realizó según el método modificado de Bouyoucos.

Para interpretar los análisis de suelo se usó la guía de niveles críticos (Cuadro 1) elaborada por el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE).

Estudios de retención de nutrimentos

Las curvas de retención se realizaron para los elementos catiónicos K, Mn, Zn y Cu, y para los aniones P, B y S. Los suelos se incubaron con soluciones de concentraciones crecientes del elemento deseado y se dejaron secar. Las concentraciones no retenidas de cada nutrimento se extrajeron y determinaron con los procedimientos convencionales descritos anteriormente.

Las concentraciones adicionadas en las curvas de elementos catiónicos aparecen junto con los resultados de extracción en el Cuadro 6.

Las curvas se usaron para determinar el porcentaje de retención de P, B y S, y para establecer las cantidades a adicionar en los tratamientos de la prueba biológica.

Análisis foliar

Los tejidos de plantas de sorgo desarrolladas en invernadero sobre los suelos en condiciones naturales (sin fertilizar), se secaron, molieron y digirieron en calor con una mezcla de metanol, H_2SO_4 y H_2O_2 al 30% (3).

Las concentraciones de Ca, Mg, K, Fe, Mn, Zn y Cu se determinaron en un espectrofotómetro de absorción atómica, y la de P por colorimetría.

Para interpretar los resultados de estos análisis foliares se utilizó la guía (preparada a partir de datos de varios autores) que se presenta en el Cuadro 2.

Prueba biológica o técnica del elemento faltante o aditivo

Esta técnica consiste en diseñar un tratamiento óptimo teórico basado en el análisis químico del suelo y en las curvas de retención. Posteriormente se establece una serie de tratamientos donde falta o se adiciona un elemento a la vez, de acuerdo a su presencia o ausencia en el óptimo. La respuesta en rendimiento de estos tratamientos es un reflejo del comportamiento individual de cada nutrimento en el suelo en presencia de cantidades adecuadas de todos los demás.

El tratamiento óptimo teórico para cada suelo consistió en la adición de K, Mn, Zn, Cu, P y S de

Cuadro 1. Guía de interpretación para análisis de suelos, adaptado de Díaz-Romeu y Hunter (3).

Elemento (unidades)	Nivel crítico	Ambito óptimo
P ($\mu\text{g}/\text{ml}$) ¹	12	20 - 80
Ca (meq/100 ml) ²	2.2	4.0 - 36
Mg (meq/100 ml) ²	0.8	2.0 - 18
K (meq/100 ml) ¹	0.2	0.4 - 3
Fe ($\mu\text{g}/\text{ml}$) ¹	10	20 - 80
Mn ($\mu\text{g}/\text{ml}$) ¹	5	10 - 100
Zn ($\mu\text{g}/\text{ml}$) ¹	3	6 - 36
Cu ($\mu\text{g}/\text{ml}$) ¹	1	3 - 20
B ($\mu\text{g}/\text{ml}$) ³	0.2	0.5 - 8
S ($\mu\text{g}/\text{ml}$) ³	12	20 - 80
Ca/Mg		1.9 - 6.2
Mg/K		3.6 - 14.0
Ca + Mg/K		10 - 60

1. Olsen Modificado 1:10

2. KCl 1 N 1:10

3. $\text{CaH}_4(\text{PO}_4)_2$ 1:2.5

Cuadro 2. Guía de interpretación para análisis foliar de sorgo de grano, adaptado de Jones (6).

Elemento (unidades)	Ambito adecuado hojas jóvenes ¹	Ambito adecuado planta entera ²
N (%)	3.2 - 4.2	3.5 - 4.0
P (%)	0.20 - 0.60	0.30 - 0.60
Ca (%)	0.15 - 0.90	0.90 - 1.30
Mg (%)	0.20 - 0.50	0.35 - 0.50
K (%)	2.0 - 3.0	3.0 - 4.5
Fe (ppm)	55 - 200	160 - 250
Mn (ppm)	6 - 100	40 - 150
Zn (ppm)	20 - 40	30 - 60
Cu (ppm)	2 - 15	8 - 15

1 Hojas jóvenes completamente desarrolladas, 37-56 días después de la siembra

2 Planta entera, 23-29 días después de la siembra.

acuerdo a las cantidades que las curvas de retención indicaron como necesarias para tener en solución tres veces el nivel crítico, valor establecido para estudios de invernadero por Diaz-Romeu y Hunter (3). El Mg se añadió hasta optimizar los equilibrios Ca-Mg-K según las relaciones señaladas en el Cuadro 1. En N se incluyó en forma uniforme para todos los suelos: una parte directamente en el suelo y otra disuelta en el agua de riego.

Los tratamientos faltantes para los elementos Mg, K, Mn, Zn, Cu, N, P y S, incluyeron lo mismo que el óptimo menos el elemento en prueba. Cuando alguno de estos elementos se encontró en suficiencia según el análisis de suelo, no quedó incluido en el óptimo y por lo tanto el tratamiento para ese nutriente fue aditivo.

Los tratamientos para Ca, Fe y Mo fueron aditivos en todos los suelos porque los dos primeros nunca aparecieron deficientes según los análisis de suelo, y del tercero, no se realizó análisis. La cantidad de elemento agregado en los tratamientos aditivos fue la sugerida por la metodología (3).

El tratamiento de B también fue siempre aditivo, sin embargo la cantidad adicionada varió según lo indicara la curva de retención respectiva. Se incluyeron además, el tratamiento testigo y un tratamiento óptimo con doble dosis de P.

Las cantidades de cada nutriente aplicadas en los diferentes tratamientos de los nueve suelos se resumen en el Cuadro 3.

Se usó 16 plantas de sorgo var. R 1029A como planta indicadora en macetas de un litro de suelo regadas por capilaridad. El experimento se cosechó

aproximadamente a la cuarta semana de desarrollo. El efecto de los tratamientos se evaluó como peso/maceta. También se estimó el peso verde/maceta, la altura de plantas, la cantidad absorbida (mg/maceta) de Ca, Mg, K, Fe, Mn, Zn, Cu y P, y las concentraciones de Ca, Mg, K, Mn, Cu y P presentes en el suelo de cada tratamiento al final del experimento.

Para calcular los mg de nutrientes absorbidos/maceta, se determinó la concentración presente en el tejido foliar de las plantas desarrolladas en cada tratamiento según el procedimiento anotado anteriormente, y después se relacionó con el peso seco correspondiente. Las concentraciones de nutrientes que quedaron en los suelos después del experimento se determinaron siguiendo las metodologías ya descritas.

El análisis estadístico de esta prueba se efectuó para cada variable de acuerdo a un diseño de bloques completos al azar y para establecer diferencias entre el tratamiento óptimo y el resto de los tratamientos se usó la prueba de Dunnett, al 0.05 (12).

La interpretación de la prueba biológica se respaldó principalmente en los resultados del análisis de la variable peso seco/maceta. Las otras variables sirvieron como comprobación de las conclusiones extraídas con el peso seco, o para indicar circunstancias particulares.

Resultados y discusión

Análisis químico de cationes en los suelos

Los nueve suelos estudiados presentan un amplio grado de similitud cualitativa en el comportamiento nutricional de los cationes.

Cuadro 3. Cantidades adicionadas a Typic Dystrandepts de Costa Rica en los tratamientos de la prueba biológica en invernadero.

Suelos	Tratamientos ¹	Cantidad adicionada $\mu\text{g/ml}$												
		N	P	2P	Ca	Mg	K	Fe	Mn	Zn	Cu	B	S	Mo
DOS RIOS	Optimo	50	570	0	0	180	0	0	0	12	0	0	252	0
	Faltantes	-50	-570			-180				-12			-252	
	Aditivos			+570	+200		+100	+20	+30		+2	+7.6		+3
SANTA MARIA	Optimo	50	580	0	0	330	0	0	0	12	0	0	120	0
	Faltantes	-50	-580			-330				-12			-120	
	Aditivos			+580	+200		+100	+20	+30		+2	+15.6		+3
BIJAGUA	Optimo	50	660	0	0	180	220	0	0	20	0	0	192	0
	Faltantes	-50	-660			-180	-220			-20			-192	
	Aditivos			+660	+200			+20	+30		+2	+14.0		+3
LA LAGUNA	Optimo	50	230	0	0	90	90	0	66	12	0	0	84	0
	Faltantes	-50	-230			-90	-90		-66	-12			-84	
	Aditivos			+230	+200			+20			+2	+4.8		+3
MONTEVERDE	Optimo	50	310	0	0	200	100	0	96	10	1	0	96	0
	Faltantes	-50	-310			-200	-100		-96	-10	-1		-96	
	Aditivos			+310	+200			+20				+1.6		+3
ZARCERO	Optimo	50	370	0	0	150	0	0	0	12	3.2	0	144	0
	Faltantes	-50	-370			-150				-12	-3.2		-144	
	Aditivos			+370	+200		+100	+20	+30			+7.6		+3
SABALITO	Optimo	50	470	0	0	0	140	0	0	12	0	0	264	0
	Faltantes	-50	-470				-140			-12			-264	
	Aditivos			+470	+200	+120		+20	+30		+2	+10.8		+3
AGUA BUENA	Optimo	50	400	0	0	180	190	0	36	12	0	0	204	0
	Faltantes	-50	-400			-180	-190		-36	-12			-204	
	Aditivos			+400	+200			+20			+2	+3.6		+3
CORREDORES	Optimo	50	400	0	0	120	0	0	72	12	1.6	0	114	0
	Faltantes	-50	-400			-120			-72	-12	-1.6		-114	
	Aditivos			+400	+200		+100	+20				+2.0		+3

¹ A cada tratamiento faltante se le adicionó lo mismo que al óptimo menos la cantidad indicada para el elemento respectivo, y a cada tratamiento aditivo se le adicionó lo mismo que al óptimo más la cantidad indicada para el elemento respectivo

En el Cuadro 4 se presentan los resultados de laboratorio que corresponden al análisis químico de los cationes y otras propiedades en los nueve suelos en estado original. Como se puede apreciar, aparecen deficiencias de Mn en cuatro de los suelos, de Zn en tres de los suelos y de K en dos de los suelos. El Ca, el Mg, el Fe y el Cu se muestran adecuados en todos los suelos.

La reacción de los nueve suelos estudiados es superior a 5, con valores de acidez intercambiable bajos y porcentajes de saturación de bases altos. Resultados similares en suelos volcánicos de Costa Rica han sido informados por Igue y Fuentes (5), y Palencia y Martini (10), quienes además mencionan el papel poco importante que juega el Al intercambiable en estos suelos.

La mayoría de los suelos presenta una relación inversa entre el Ca y el Cu (Cuadro 5), explicable por la mayor solubilidad que presenta el Cu a pH ácidos. Sin embargo, esta relación no se manifestó con elementos más susceptibles a la acidez como el Mn y el Zn. Las proporcionalidades directas entre el Mn y el Zn, y el Mn y el Cu, confirman el comportamiento semejante que presentan estos tres cationes debido a su carácter y tamaño iónico.

En el Cuadro 5 se presentan índices de correlación significativos e inversos entre la cantidad de materia orgánica y los tres microelementos más susceptibles de formar organominerales (Cu, Fe y Zn). Este resultado ratifica la activa participación de los materiales orgánicos en estos suelos, ya que a través de sus efectos quelatantes pueden determinar la

Cuadro 4. Análisis químico de Typic Dystrandeps de Costa Rica.

Propiedades químicas	Suelos								
	Dos Rios	Santa María	Bijagua	La Laguna	Monteverde	Zarcero	Sabalito	Agua Buena	Corredores
pH H ₂ O	5.7	5.7	5.8	6.2	6.0	5.9	6.0	5.6	6.0
pH KCl	5.1	5.0	5.2	5.6	5.4	5.1	5.1	5.0	5.4
Acidez (meq/100 ml)	0.10	0.09	0.12	0.09	0.08	0.08	0.09	0.12	0.08
Ca (meq/100 ml)	3.2	6.6	11.3	9.4	10.3	7.4	6.4	4.8	7.9
Mg (meq/100 ml)	0.9	2.5	1.7	2.2	1.6	2.1	3.1	1.3	2.7
K (meq/100 ml)	0.45	0.76	0.11 ^D	0.34	0.36	0.60	0.32	0.15 ^D	0.79
Fe (µg/ml)	110	73	73	56	62	87	49	50	31
Mn (µg/ml)	24	81	30	4 ^D	3 ^D	8	11	4 ^D	2 ^D
Zn (µg/ml)	6.0	7.3	3.8	3.7	5.6	4.1	2.6 ^D	2.5 ^D	2.6 ^D
Cu (µg/ml)	25.0	22.0	7.6	6.5	3.8	6.0	8.7	9.2	3.3
Bases (meq/100 ml)	4.55	9.86	13.11	11.94	12.26	10.10	9.82	6.25	11.39
Saturación de bases (%)	97.8	99.1	99.1	99.3	99.4	99.2	99.1	98.1	99.3

Laboratorio de Suelos, MAG, Costa Rica

D = deficiente, inferior al nivel crítico según la guía de interpretación, Cuadro 1

Cuadro 5. Correlaciones significativas entre características químicas de Typic Dystrandeps de Costa Rica.

Características correlacionadas		Valor r
pH KCl	vs	pH H ₂ O
Ca (meq/100 ml)	vs	Cu (µg/ml)
Mn (µg/ml)	vs	Zn (µg/ml)
Mn (µg/ml)	vs	Cu (µg/ml)
Materia orgánica (%)	vs	Fe (µg/ml)
Materia orgánica (%)	vs	Zn (µg/ml)
Materia orgánica (%)	vs	Cu (µg/ml)
Fe (µg/ml)	vs	Zn (µg/ml)
Zn (µg/ml)	vs	Cu (µg/ml)
Cu (µg/ml)	vs	Fe (µg/ml)

+ Significativo, al 0.05

++ Altamente significativo, al 0.01

disponibilidad de algunos elementos menores. Por su parte, las concentraciones de Cu, Fe y Zn, correlacionaron positivamente entre sí.

Estudio de retención de cationes

En comparación con los aniones, el fenómeno de retención de cationes en suelos volcánicos resulta de poca importancia; la magnitud es baja y el comportamiento desuniforme. El Cuadro 6 resume los resultados de las curvas de retención para cada cation estudiado en los nueve suelos.

Bajo condiciones de laboratorio todos los suelos fijan Zn. sin embargo, el fenómeno no afecta el crecimiento de las plantas (Cuadro 8). Es probable que esta sobrestimación del problema de Zn ocurra porque el nivel crítico que se usó es muy alto. La retención de K y Mn se presenta en aquellos suelos donde el análisis de suelos también señaló problemas, dos y cuatro casos, respectivamente. Además, tres suelos presentan retención de Cu. En general no existió correlación de estos resultados con el crecimiento en el invernadero (Cuadro 8). Es probable que sea la etapa forzada de incubación bajo condiciones de laboratorio la que estimule esta retención de cationes.

Cuadro 6. Curvas de retención de potasio, manganeso, zinc y cobre en Typic Dystrandepts de Costa Rica.

Nutrimentos	Cantidades agregadas $\mu\text{g/ml}$	Cantidades extraídas en cada suelo $\mu\text{g/ml}$								
		Dos Ríos	Santa María	Bijagua	La Laguna	Monte-verde	Zarcero	Sabalito	Agua Buena	Corredores
POTASIO ⁺	0.0	0.46	0.95	0.07	0.34	0.31	0.60	0.24	0.10	0.70
	17.5	0.49	0.96	0.10	0.39	0.34	0.64	0.27	0.13	0.68
	35.0	0.52	1.03	0.16	0.46	0.39	0.72	0.32	0.18	0.79
	70.0	0.64	1.13	0.23	0.56	0.49	0.77	0.41	0.26	0.85
	140.0	0.76	1.23	0.39	0.74	0.70	0.96	0.58	0.44	1.05
	210.0	1.00	1.43	0.58	0.95	—	—	0.81	0.62	1.25
	280.0	1.23	1.60	0.74	1.29	1.07	1.35	1.00	0.89	1.47
	350.0	1.38	1.72	0.93	1.40	1.27	1.53	1.18	1.07	1.67
	420.0	1.55	1.92	1.11	1.60	1.47	1.75	1.35	1.23	1.87
	560.0	2.00	+2.00	1.45	2.03	1.95	+2.00	1.77	1.60	+2.00
	700.0			1.79		+2.00		2.00	2.03	
MANGANESO	0.0	+100.0	83.0	+100.0	3.0	3.0	26.0	23.0	4.0	1.5
	2.5		86.0		3.0	4.0	31.0	20.5	4.0	2.0
	5.0		88.0		3.5	3.0	33.0	20.0	5.0	2.0
	10.0		89.0		4.0	3.5	22.5	19.0	5.5	2.5
	20.0		92.0		4.5	4.0	20.0	19.0	8.0	3.5
	30.0		+100.0		5.0	—	—	19.0	12.0	4.5
	40.0				6.5	5.0	28.5	23.5	17.0	6.0
	50.0				8.5	6.0	34.0	29.0	24.0	8.0
	60.0				10.0	6.0	40.0	34.0	32.0	10.0
	80.0				23.5	8.0	66.0	51.5	47.0	22.0
	100.0				51.0	14.0	85.0	73.0	68.5	41.0
ZINC	0.0	4.8	7.0	8.2	3.8	4.4	3.0	3.2	3.6	2.3
	1.0	5.8	6.7	7.4	3.0	4.5	3.7	3.0	4.2	3.8
	2.0	5.6	6.7	9.0	7.0	6.0	4.8	4.8	4.1	4.2
	4.0	5.6	6.7	8.0	7.2	5.8	4.8	5.5	5.4	4.8
	8.0	7.0	7.0	7.6	7.5	8.0	6.8	6.5	6.8	7.2
	12.0	8.2	8.6	9.4	8.6	—	—	8.4	8.2	8.8
	16.0	10.2	8.6	8.3	11.0	12.4	11.0	12.0	11.2	11.8
	20.0	11.2	10.2	8.6	13.6	14.2	13.0	13.2	13.6	12.0
	24.0	13.2	12.7	13.4	16.2	16.8	16.2	15.6	16.0	16.2
	32.0	16.2	14.0	11.7	17.6	20.0	19.8	18.4	+20.0	19.8
	40.0	17.8	14.6	13.6	17.6	+20.0	+20.0	+20.0		+20.0
COBRE	0.0	23.0	18.5	7.0	3.0	3.0	4.0	7.0	8.0	3.0
	1.0	23.0	17.5	7.5	4.0	3.0	4.0	7.0	8.5	3.0
	2.0	23.0	19.0	8.0	4.0	3.0	4.0	7.5	9.0	3.5
	4.0	25.0	20.5	8.5	5.0	4.0	5.0	8.0	9.5	4.0
	8.0	26.0	21.0	9.0	6.0	6.0	7.5	10.0	12.0	5.5
	12.0	28.0	23.0	10.5	7.0	—	—	11.0	14.0	6.5
	16.0	31.0	23.5	11.5	10.0	9.5	11.5	13.0	16.5	8.0
	20.0	33.0	28.0	12.5	11.5	11.0	13.5	16.0	20.0	9.0
	24.0	35.0	31.0	15.0	13.0	13.0	16.0	18.0	22.0	11.5
	32.0	41.0	33.5	16.5	17.5	17.0	20.0	21.0	28.0	14.0
	40.0	42.0	37.0	19.5	19.0	20.0	24.0	24.0	29.0	18.0

Laboratorio de suelos, MAG, Costa Rica.

⁺ Las cantidades extraídas de K corresponden a meq/100 ml

Cuadro 7. Contenido foliar de nutrimentos en plantas de sorgo desarrolladas bajo condiciones de invernadero en Typic Dystrandepts sin fertilizar, de Costa Rica.

Nutrimentos	Suelos								
	Dos Ríos	Santa María	Bijagua	La Laguna	Monte-verde	Zarcero	Sabalito	Agua Buena	Corredores
Ca (%)	0.38	0.59	0.67	0.45	0.59	0.72	0.45	0.90	0.43
Mg (%)	0.29	0.46	0.42	0.28	0.30	0.45	0.43	0.65	0.32
K (%)	1.76 ^D	1.76 ^D	0.94 ^D	2.79	2.74	3.75	2.92	1.03 ^D	3.42
Fe (ppm)	47 ^D	182	91	91	61	13	87	52 ^D	121
Mn (ppm)	279	182	108	31	35	82	72	86	111
Zn (ppm)	16 ^D	59	37	30	24	59	24	18 ^D	30
Cu (ppm)	17.6	23.5	26.4	12.0	8.8	19.3	11.7	12.2	13.8

Laboratorio de Suelos, CATIE, Costa Rica.

D = deficiente, inferior a los ámbitos adecuados según la guía de interpretación para análisis foliar de sorgo para grano, Cuadro 2.

Cuadro 8. Resultados cualitativos de la prueba biológica (técnica del elemento faltante o aditivo) practicada en invernadero sobre Typic Dystrandepts de Costa Rica.

Nutrimentos	Suelos								
	Dos Ríos	Santa María	Bijagua	La Laguna	Monte-verde	Zarcero	Sabalito	Agua Buena	Corredores
Calcio	D	A	A	A	A	A	A	A	A
Magnesio	A	A	A	<u>R</u>	A	A	A	A	A
Potasio	<u>D</u>	A	A	<u>R</u>	A	A	<u>R</u>	<u>D</u>	A
Hierro	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Manganeso	A	A	A	A	A	A	A	<u>D</u>	A
Zinc	A	A	A	A	A	A	A	<u>R</u>	A
Cobre	<u>D</u>	<u>R</u>	A	A	A	A	A	A	A

A = adecuado, diferencia no significativa con respecto al óptimo según el peso seco y según otras variables, Prueba de Dunnett

R = posible respuesta, diferencia no significativa con respecto al óptimo según el peso seco, pero diferencia significativa con respecto al óptimo según otras variables, Prueba de Dunnett.D = deficiente, diferencia significativa con respecto al óptimo según el peso seco y según otras variables, Prueba de Dunnett

Análisis foliar de nutrimentos catiónicos

El contenido foliar de nutrimentos presente en plantas de sorgo desarrolladas en el invernadero en los suelos sin fertilizar, se expone en el Cuadro 7

Las plantas de sorgo creciendo en los suelos de Bijagua, Agua Buena, Dos Ríos y Santa María muestran una concentración de K foliar baja (menos de 2%) En los dos primeros suelos esta concentración es reflejo del bajo contenido de este elemento en el suelo (menos de 0.2 meq de K/100 ml), mientras que en

los dos últimos es probable que se presente una lenta velocidad de restitución del elemento a partir de formas moderadamente disponibles, que impide satisfacer adecuadamente la demanda de plantas en crecimiento activo (1).

La deficiencia de Mn esperada según el análisis químico en cuatro suelos, no se manifiesta en ningún caso a través de las concentraciones foliares; la de Zn, apuntada para los tres suelos de la zona sur, sólo se comprueba foliarmente para el suelo de Agua Buena, y en oposición con lo expresado por el análisis de

suelo, en Dos Ríos hay insuficiencia de Zn en los tejidos de sorgo. Esta contradicción enfatiza la necesidad de afinar los estudios de correlación para el Zn. Por otra parte, las plantas que crecen en los suelos de Dos Ríos y Agua Buena muestran concentraciones bajas de Fe en sus tejidos.

Prueba biológica

Como los alcances de una prueba a nivel de invernadero son esencialmente cualitativos, la interpretación de los resultados de este experimento se hizo considerando las siguientes categorías de calidad de problemas: (i) **D** que hace referencia a los nutrimentos que manifiestan deficiencia comprobada a través del peso seco/maceta y otras variables; (ii) **R** que se refiere a los nutrimentos que manifiestan posibilidades de respuesta, y (iii) **A** que identifica a los nutrimentos que, de acuerdo a la respuesta biológica de la planta indicadora, se encuentran en cantidad adecuada en el suelo.

En el Cuadro 8 se presenta la interpretación cualitativa de los resultados de la prueba biológica para los nutrimentos catiónicos, practicada en el invernadero sobre los nueve suelos en estudio.

En forma esporádica y más como posible respuesta a la adición del elemento que como deficiencia muy limitante en la producción se presenta respuesta al K en cuatro de los suelos, respuesta al Cu en dos de los suelos y respuesta al Ca, Mg, Mn y Zn en uno de los suelos.

El K se manifiesta deficiente en dos suelos, Dos Ríos y Agua Buena, y con posibilidades de responder en otros dos, La Laguna y Sabalito. Los contenidos de K en estos cuatro suelos corresponden a 0.45, 0.15, 0.34 y 0.32 meq/100 ml, respectivamente. De acuerdo a Sticher (13) en los suelos volcánicos, además del K intercambiable externo, extraíble con una solución de Olsen modificada, es posible encontrar K parcialmente atrapado en los microporos de la alofana. En esta condición interna el K constituye una fracción moderadamente disponible que es capaz de restituir, a diferentes velocidades, el K intercambiable conforme éste va siendo usado. Una extracción de K con Olsen modificado en modo alguno aclara la dinámica de esta fracción de reserva. Por lo tanto, la deficiencia y posibilidad de respuesta encontrada en suelos con más de 0.2 meq de K/100 ml de suelo puede atribuirse a una baja velocidad de restitución acentuada aún más por los efectos del invernadero y por las altas concentraciones requeridas por la planta durante esas cuatro primeras semanas de crecimiento. En el suelo Bijagua, con 0.11 meq de K/100 ml es probable que las plantas crezcan en forma

adecuada debido contrariamente, a una eficiente restitución del K intercambiable a partir de la fracción moderadamente disponible mencionada con anterioridad.

Dada la discrepancia entre los datos de análisis del suelo y la respuesta biológica a la adición de K, también anotada por Suárez (11), quizá debería considerarse la determinación de la velocidad de restitución de K como un parámetro necesario para estimar la respuesta a la adición de este elemento en el campo.

El Mn y el Zn parecía que iban a jugar un papel limitante sobre la producción, pues están poco disponibles en los suelos, sin embargo no fue así. En estos suelos, el rejuvenecimiento continuo de cenizas y su meteorización simultánea, aunque los niveles disponibles sean bajos, puede conducir a un suplemento adecuado de algunos elementos menores. También, al favorecerse la mineralización de la materia orgánica, hay liberación proporcional de todos los elementos.

El Fe no manifiesta problemas ni respuestas en ninguno de los suelos, debido al carácter andesítico o basáltico de las cenizas originarias que garantiza altos contenidos de Fe, a través de minerales como el olivino.

Respuestas a Cu se presentan en forma aislada únicamente en los suelos de la Cordillera de Guana-caste. Esto ratifica la participación del material parental en el suplemento de micronutrimentos (8), especialmente en suelos relativamente jóvenes. El efecto quelatante de la materia orgánica es posible que también juegue un papel fundamental en la indisponibilidad de Cu (14).

Los suelos de Zarcero, Sabalito, La Laguna y Santa María tienden a presentar las más altas producciones de materia seca, y los de Dos Ríos, Monteverde y Agua Buena, las más bajas. El factor más asociado con esta secuencia de crecimiento parece ser la fertilidad inicial del suelo. La correlación entre los crecimientos máximos y los crecimientos de los tratamientos testigo de cada suelo es significativa, directa y superior a 0.7. En presencia de fertilización, las mayores producciones de materia seca se obtendrán en aquellos suelos volcánicos cuyos niveles de fertilidad natural sean más altos.

Los componentes nutricionales del suelo que determinan en forma directa la fertilidad natural de los Typic Dystrandept, son las bases. Este efecto se pudo identificar a través de correlaciones simples entre los crecimientos máximos y los de los tratamientos testigo con cada uno de los aspectos eva-

Cuadro 9. Indices de correlación entre los tratamientos con crecimiento máximo y testigo de nueve Typic Dystrandepts de Costa Rica en invernadero, y las características químicas de los suelos.

Crecimientos	Características químicas			
	pH H ₂ O	Acidez (meq/100 ml)	Mg (meq/100 ml)	Suma de bases
TESTIGO	0.82 ⁺⁺	-0.72 ⁺	0.90 ⁺⁺	0.68 ⁺
MAXIMO	0.69 ⁺	-0.48	0.65 ⁺	0.35

+ Significativo, al 0.05.

++ Altamente significativo, al 0.01.

luados en el análisis del suelo inicial. Los resultados de estas correlaciones se presentan en el Cuadro 9.

El cociente entre el crecimiento máximo y el crecimiento del testigo se llama Índice de Respuesta a la Fertilización. En los suelos con fertilidad natural baja, o sea con pH bajo y niveles de Ca y Mg bajos, el valor de este índice es alto, mientras que en los suelos ricos en bases el índice es bajo. Lo anterior significa que en los suelos volcánicos hay mayor respuesta a la fertilización cuando el suelo es pobre que cuando es rico en bases.

El síntesis se puede establecer que la fertilidad natural de los Typic Dystrandepts definida por la reacción del suelo y la presencia de Ca y Mg, determina en forma directa el nivel de crecimiento que se dé sobre estos suelos, e inversamente su respuesta a la fertilización; más aún se puede enfatizar en su respuesta al P, por ser este el elemento fundamentalmente crítico.

Así, las bases Ca y Mg, pese a que por ellas mismas no ocasionan problemas directos en estos suelos, juegan un papel nutricional importante. Su nivel, influenciado por el grado de madurez del suelo y la precipitación de la zona (4) determinan la fertilidad natural de estos suelos, y por lo tanto, su capacidad máxima de expresión en crecimiento.

Conclusiones

Los nueve Typic Dystrandepts estudiados son semejantes cualitativamente en el comportamiento nutricional de los cationes.

La deficiencia de K constituye posiblemente, después del P, la segunda limitación nutricional de estos suelos, y como el análisis químico no resulta eficiente en su detección, ésta debe hacerse de preferencia a través de experimentación biológica.

Las bases Ca y Mg determinan la fertilidad natural de estos suelos y la capacidad máxima de expresión en crecimiento, por lo tanto, el pH y la cantidad de bases constituyen un índice práctico de la fertilidad potencial de los suelos volcánicos. El Al intercambiable no juega un papel importante en estos suelos.

El Mn y el Zn no manifiestan problemas que trasciendan y ningún suelo presenta problemas con el Fe. Respuestas a Cu solo se presentan en forma esporádica en los suelos de la Cordillera de Guanacaste.

Las concentraciones de nutrimentos catiónicos en Typic Dystrandepts de Costa Rica oscilan, con un 90% de probabilidad estadística, en los siguientes ámbitos: Ca entre 3.2 y 11.7 meq/100 ml, Mg entre 0.9 y 3.2 meq/100 ml, K entre 0.03 y 0.83 meq/100 ml, Fe entre 27 y 104 µg/ml, Mn entre trazas y 60 µg/ml, Zn entre 1.4 y 7.0 µg/ml y Cu entre trazas y 23 µg/ml. El pH en agua fluctúa entre 5.6 y 6.2 y en KCl lo hace entre 4.9 y 5.6. La acidez intercambiable oscila entre 0.07 y 0.12 meq/100 ml.

La concentración en el tejido foliar de sorgo desarrollado en el invernadero sobre estos suelos varía para Ca entre 0.30 y 0.85%, para Mg entre 0.20 y 0.59%, para K entre 0.68 y 4.01%, para Fe entre 29 y 167 ppm, para Mn entre trazas y 237 ppm, para Zn entre 7 y 59 ppm y para Cu entre 8 y 26 ppm.

Resumen

Se estudió bajo condiciones de laboratorio e invernadero la fertilidad de nueve Typic Dystrandepts de Costa Rica. Se hicieron análisis químicos de suelo, estudios de retención de K, Mg, Mn, Zn, Cu, P, B y S, análisis foliares del tejido de plantas desarrolladas sobre los suelos sin fertilizar, y se instaló una prueba biológica en invernadero con la técnica del elemento faltante o aditivo, en macetas de un litro usando

sorgo como planta indicadora. Se siguió la metodología descrita por Díaz-Romeu y Hunter para diagnósticos cualitativos de fertilidad.

A nivel cualitativo existe semejanza en el comportamiento nutricional de los elementos catiónicos en los nueve suelos. Según la prueba biológica, después del P la deficiencia de K constituye posiblemente, la segunda limitación nutricional de estos suelos. El pH y la cantidad de bases constituyen un índice práctico de la fertilidad potencial de los suelos volcánicos, ya que los contenidos iniciales de Ca y Mg son los que determinan su fertilidad natural. El Al intercambiable no juega un papel importante en estos suelos. El Mn y el Zn no manifiestan problemas que trasciendan y ningún suelo presenta problemas con el Fe. Respuestas a Cu solo se presentan en forma esporádica en los suelos de la Cordillera de Guanacaste.

La concentración de Ca en Typic Dystrandeps de Costa Rica oscila, con un 90% de probabilidad estadística, entre 3.2 y 11.7 meq/100 ml, la de Mg entre 0.9 y 3.2 meq/100 ml, la de K entre 0.03 y 0.83 meq/100 ml, la de Fe entre 27 y 104 µg/ml, la de Mn entre trazas y 60 µg/ml, la de Zn entre 1.4 y 7.0 µg/ml y la de Cu entre trazas y 2.3 µg/ml. El pH en agua fluctúa entre 5.6 y 6.2 y el KCl lo hace entre 4.9 y 5.6. La acidez intercambiable oscila entre 0.07 y 0.12 meq/100 ml.

En el tejido foliar de sorgo desarrollado en el invernadero sobre estos suelos la concentración varía para Ca entre 0.30 y 0.85%, para Mg entre 0.20 y 0.59%, para K entre 0.68 y 4.01%, para Fe entre 29 y 167 ppm, para Mn entre trazas y 237 ppm, para Zn entre 7 y 59 ppm y para Cu entre 8 y 26 ppm.

Literatura citada

1. ARIAS, O. E. Capacidad de restitución de potasio en algunos suelos cafetaleros de Costa Rica. Tesis Ing. Agr. San José, Universidad de Costa Rica, Facultad de Agronomía, 1971. 79 p.
2. CERVANTES, C. A. Caracterización de la fracción mineral y determinación del ZPC en cuatro andepts de la provincia de Guanacaste. Tesis Ing. Agr. San José, Universidad de Costa Rica, Facultad de Agronomía, Escuela de Fitotecnia, 1977. 66 p.
3. DIAZ-ROMEU, R. y HUNTER, A. Metodología de muestreo de suelos, análisis químico de suelos y tejido vegetal e investigación en invernadero. Turrialba, Costa Rica, CATIE, 1978. 68 p.
4. EGAWA, T. Propiedades de los suelos derivados de cenizas volcánicas. In Ishizuka, Y. y Black, C. A., eds. Suelos derivados de cenizas volcánicas en Japón. México, CIMMYT, 1980. pp. 14-67.
5. IGUE, K. y FUENTES, R. Characterization of Al in volcanic ash soils. Soil Science Society of America Proceedings 36(2):292-296. 1972.
6. JONES, J. B. Plant analysis as an aid in fertilizing corn and grain sorghum. In Walsh, L. M. y Beaton, J. D., eds. Soil testing and plant analysis. Madison, Wisconsin. Soil Science Society of America, 1973. p. 359.
7. LOPEZ, H. Caracterización de la fracción mineral en cinco andepts de los cantones de Corredores y Coto Brus. Tesis Ing. Agr. San José, Universidad de Costa Rica, Facultad de Agronomía, Escuela de Fitotecnia, 1978. 51 p.
8. MARTINI, J. A. Caracterización del estado nutricional de los principales andosoles de Costa Rica mediante la técnica del elemento faltante en invernadero. Turrialba 20:72-84. 1970.
9. MENDEZ, L. F. Clasificación y caracterización de cinco andepts de la cordillera volcánica de Guanacaste. Tesis Ing. Agr. San José, Universidad de Costa Rica, Facultad de Agronomía, Escuela de Fitotecnia, 1977. 55 p.
10. PALENCIA, J. A. y MARTINI, J. A. Características morfológicas, físicas y químicas de algunos suelos derivados de cenizas volcánicas en Centroamérica. Turrialba 20(3):325-332. 1970.
11. SUAREZ, A. Caracterización del estado del potasio en tres grandes grupos de suelos de Costa Rica. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica. IICA-CEI, 1968. 305 p.
12. STEEL, R. G. D. y TORRIE, J. H. Principles and procedures of statistics, with special reference to the biological sciences. New York, McGraw Hill, 1960. 481 p.
13. STICHER, R. Potassium in allophane and in zeolites. In Colloquium of the International Potash Institute. 9th. Landshut, Germany, Potassium in soil. Berne, 1972. pp. 43-51.
14. TANAKA, A. Problemas nutricionales y el uso de fertilizantes. In Ishizuka, Y. y Black, C. A., eds. Suelos derivados de cenizas volcánicas en Japón. México, CIMMYT, 1980. pp. 89-106.

Reseña de libros

BURTON, W. G. *The Potato. A survey of its history and of factors influencing its yield, nutritive value, quality and storage*. Segunda edición. H. Veenman & Zonan B. V., Wageningen, Holanda. 1966. 382 p. (completamente revisada).

El libro señala en primer lugar la importancia de la papa alimento, que sigue a nivel mundial a los cereales. Al indicar la distribución de la producción de papas y su consumo *per capita*, señala especialmente a Chile, Perú y Ecuador, donde las cifras dadas incluirían otros cultivos tuberosos, como batata. Este es un error pues Chile difícilmente cultiva más de 200 ha con batata. Podría ser efectivo para Perú y Ecuador donde si se cultiva la batata y yuca.

Burton adopta para las papas cultivadas la designación general de Dodds (1962) de *Solanum tuberosum*, que reconoce cinco grupos de acuerdo a su grado de ploidía y por caracteres morfológicos y fisiológicos. Estos son: *Stenotomum* y *Pluveja* (diploides); *Chaucha* (triploide); *Andigena* y *Tuberosum* (tetraploides). Agrega Burton, grupo chileno (tetraploides cultivados en Chile) y es la nomenclatura que usa en su texto.

Se hace una historia detallada de la introducción de la papa en Europa, en especial, en Gran Bretaña.

Respecto a variedades, se señala una descripción de las diversas partes de la planta, se recalca el principio de la pureza varietal y se describen las principales variedades inglesas. En la sección sobre efecto del clima, suelo, largo del período vegetativo y translocación se presentan interesantes conclusiones obtenidas por diferentes investigadores, como el mismo Burton, Borah y Milthorpe, Bodlaender, etc., trabajos muy adecuados a las regiones templadas — que en el caso nuestro pudieran servir a Argentina y Chile, pero que no siempre son válidas en las regiones de la franja tropical, donde el período de iluminación es corto 11 y

1/2 a 12 y 1/2 horas y las temperaturas van de 10°C en las partes altas a 25°C en las partes bajas (caso Venezuela), existiendo también casi permanentemente un cielo nublado cubierto.

Los capítulos sobre abonamiento, efecto de las enfermedades y plagas en el rendimiento y "semilla" y plantación, están muy documentados y sus recomendaciones son una guía parcial (debido a la falta de la gran información producida en los últimos 20 años), para los diversos tipos de explotaciones paperas, ya sea en el trópico — donde está nuestro mayor interés — o en las regiones templadas.

Sobre composición química, valor nutritivo y calidad culinaria de los tubérculos hay una documentada revisión. Es interesante la sección sobre fisiología de postcosecha y almacenamiento, ya que este es un vacío de conocimientos en Latinoamérica y es junto con las enfermedades, la principal causa de deterioro de las cosechas en los diversos países. El texto hace una clara distinción entre almacenamiento para "papa-semilla" y "papa-consumo" y señala resultados de investigaciones a diversas temperaturas con la evolución de los almidones y los azúcares.

El texto, en general, es una muy buena revisión de los aspectos fisiológicos de la papa, tema en el cual el autor es una autoridad de renombre mundial.

Este libro es de valor para investigadores en Europa y en regiones templadas, hacia quienes debe, posiblemente, haber estado dirigido.

La literatura revisada es amplísima pero, como ya se señaló, sólo abarca hasta 1964, e incluye un 56% de autores de Gran Bretaña, 20% de Europa y 25% de Estados Unidos y Canadá. Latinoamérica tiene ya más de 40 años de trabajos de investigación en papa, en un medio ecológico totalmente diferente, pero se ve que aún no tiene valor para los investigadores de los países desarrollados.

ALVARO MONTALDO
FACULTAD DE AGRONOMIA
MARACAY, VENEZUELA

F. BERTSCH*
A. CORDERO*

Summary

The studied anions present similar nutritional characteristics in the nine Typic Dystrandepts of Costa Rica. P deficiency is the main limiting problem, and in practice, the only one. P retention percent varies between 80 and 95% (additions of 225-660 µg P/ml to extract with Olsen modified solution three times the critical level of 12 µg/ml). The soils from the Cordillera de Guanacaste present the highest P retention values. When no P was applied, yields were statistically equal to the test plot even when all other elements were added. Every soil responded significantly to P in direct relation to natural fertility.

The N supply derived from the mineralization of high organic matter content (4.8-24.4%) is not a limiting factor. In the greenhouse, in these soils, it is preferable to promote mineralization by applying P instead of adding additional N. Under laboratory conditions, B and S retention occurs at 85-96% and S at 70-91% (1.6-15.6 µg B/ml and 84-264 µg S/ml in extracts with CaH₄(PO₄)₂ solution three times the corresponding critical level) No response only appeared in a soil of the Cordillera de Guanacaste.

P concentration in Typic Dystrandepts of Costa Rica varies, with a 90% statistical probability, between 1 and 3 µg/ml, B, between 0.06 and 0.56 µg/ml and S, between 7 and 29 µg/ml. The texture of nine soils tends to be loam. P concentration in foliar tissue of sorghum grown in the greenhouse on these soils varies from 0.06 to 0.09%.

Introducción

Dadas las características del complejo coloidal de los andepts "andosoles" o suelos derivados de cenizas volcánicas, los aniones constituyen los nutrimentos con mayores problemas de disponibilidad en estos suelos. Por esta razón, los conocimientos que permitan efectuar un manejo adecuado de los nutrimentos aniónicos tendrán fuerte repercusión económica en la producción sobre estos suelos.

Materiales y métodos

La metodología empleada para el estudio del comportamiento de N, P, B, S, Mo, materia orgánica y textura en Typic Dystrandepts de Costa Rica se describe en la primera parte de este trabajo (2), donde además, se discute el comportamiento de las bases (Ca, Mg y K), la acidez y los elementos menores catiónicos (Fe, Mn, Zn y Cu) en estos suelos.

Resultados y discusión

Análisis químico de aniones en los suelos

Los nueve suelos estudiados presentan un amplio grado de similitud cualitativa en el comportamiento nutricional de los aniones.

¹ Recibido para publicación el 30 de marzo de 1984.

La primera autora agradece al Dr. Alfredo Alvarado y al Dr. Elemer Bornemisza su generoso apoyo personal y colaboración en la elaboración del presente artículo.

* Escuela de Fitotecnia, Universidad de Costa Rica.

En el Cuadro 1 se presentan los resultados de laboratorio que corresponden al análisis químico de los aniones y otras propiedades en los nueve suelos en estado original. Como se puede apreciar, la severa deficiencia de P se presenta en todos los suelos, y en orden de importancia aparecen otros problemas como deficiencias de B en cinco de los suelos y deficiencia de S en el suelo de Agua Buena.

De acuerdo al Cuadro 2, el P disponible correlaciona positivamente con el pH, sin embargo, para todos los suelos las concentraciones de P soluble son inferiores a 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La concentración de S es proporcional a la P; es probable que esta relación se deba a que en ambos casos la disponibilidad depende de la mineralización de la materia orgánica y a que su intercambio y retención obedecen a mecanismos similares (18). Fox (8) encontró que la disponibilidad de S en andepts de Costa Rica varía con el grado de desarrollo de los suelos, ligado al aumento en el contenido de materia orgánica. La disponibilidad de B también aumenta con incrementos en el pH y su concentración varía independientemente de los contenidos de P y S, de los cuales, según Bingham y Page (3), también se diferencia en su mecanismo de retención.

El contenido de materia orgánica oscila entre 5 y 25%. Valores similares han sido encontrados en otros andepts de Costa Rica (1, 10) y se asocian siempre con elevados contenidos de alofana.

La textura de los suelos tiende a ser franca, con un solo suelo arcilloso. La presencia de fracciones gruesas en el suelo indica un grado medio de meteorización, correspondiente en este caso a materiales depositados en el Holoceno bajo un vulcanismo activo (11).

Estudio de retención de aniones

Los nueve suelos presentan retención de P, B y S, siendo la de P la más severa. El Cuadro 3 resume los resultados de las curvas de retención para cada anión en los nueve suelos.

En el caso del P, para extraer 36 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (tres veces el nivel crítico de 12 $\mu\text{g}/\text{Pml}$) se requieren entre 230 y 660 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de P (Figura 1). Estos altos valores resaltan la intensa reacción que ocurre entre los materiales amorfos y el anión fosfato, a través de adsorción superficial de baja y alta afinidad (9) seguida por precipitación (7, 15). El fenómeno de retención de P alcanza magnitudes que repercuten agrónomica y económicamente sobre el manejo de estos suelos. El ámbito de retención de P entre los nueve Typic Dystrandeps estudiados (Figura 1), es más amplio cuando se adiciona mayor cantidad de P porque ocurre una disrupción estructural del coloide alofánico; la mayor afinidad del Al en relación al Si hacia el ión fosfato, produce el desplazamiento del silicato estructural y el aumento de la superficie de cambio y de la capacidad de retención de P del suelo (19).

Por otro lado, un índice de correlación de 0.88 entre las curvas de retención de P de los nueve suelos y un porcentaje de retención siempre superior a 80% indican una fuerte semejanza en el comportamiento de estos suelos frente al P (Figura 1).

Los tres suelos de la Cordillera de Guanacaste (Bijagua, Dos Ríos y Santa María) presentan valores de retención de P muy altos, superiores a 93%. La teoría sugiere que esto ocurre por la presencia de mayores contenidos de alofana aluminica, tipos A (4) y

Cuadro 1. Análisis químico de Typic Dystrandeps de Costa Rica.

Propiedades químicas	Suelos								
	Dos Ríos	Santa María	Bijagua	La Laguna	Monteverde	Zarcero	Sabalito	Agua Buena	Corredores
P ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	2 ^D	1 ^D	2 ^D	2 ^D	2 ^D	2 ^D	1 ^D	1 ^D	3 ^D
B ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	0.16 ^D	0.12 ^D	0.14 ^D	0.62	0.40	0.39	0.06 ^D	0.09 ^D	0.28
S ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	13	16	18	21	18	29	14	6 ^D	24
Materia orgánica (%)	7.6	5.4	17.4	10.4	15.0	12.7	19.7	18.6	23.2
Textura	F	A	F-ar	F-ar	F-ar	F	F-ar	F-ar	F

Laboratorio de Suelos, MAG, Costa Rica

D = deficiente, inferior al nivel crítico según la guía de interpretación, Cuadro 1 (2)

F = Franca A = Arcillosa F-ar = Franco-arenosa

Cuadro 2. Correlaciones significativas entre características químicas de Typic Dystrandepts de Costa Rica.

Características correlacionadas		Valor r
P ($\mu\text{g/ml}$)	vs pH_{KCl}	0.65 [‡]
P ($\mu\text{g/ml}$)	vs S ($\mu\text{g/ml}$)	0.66 ⁺
B ($\mu\text{g/ml}$)	vs pH_{KCl}	0.82 ⁺⁺
B ($\mu\text{g/ml}$)	vs $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}$	0.66 ⁺

+ Significativo, al 0.05.

++ Altamente significativo, al 0.01.

Si/Al = 2 (16), que permanecen en el perfil debido a la predominancia de un régimen carente de período seco intenso y definido que estimule la cristalización (13)

Para el B la cantidad necesaria a adicionar para extraer 0.6 $\mu\text{g/ml}$ de B, varía entre 1.6 y 15.6 $\mu\text{g/ml}$; y para el S se requieren entre 84 y 264 $\mu\text{g/ml}$

de S para obtener en solución, en condiciones de laboratorio, 36 $\mu\text{g/ml}$ de S, que corresponde a tres veces su nivel crítico. La retención de B y S en los nueve suelos estudiados varía entre 85-96% y 70-91%, respectivamente.

Análisis foliar de P

El porcentaje de P foliar presente en plantas de sorgo desarrolladas en el invernadero, en los suelos sin fertilizar, corresponde a 0.06% en dos suelos (Bijagua y La Laguna), a 0.07% en otros dos (Santa María y Monteverde), y a 0.08% en los otros.

Estas bajas concentraciones confirman la generalizada deficiencia de este nutrimento en los Typic Dystrandepts.

Prueba biológica

En el Cuadro 4 se presenta la interpretación cualitativa de los resultados de la prueba biológica para los nutrimentos aniónicos, practicada en invernadero sobre los nueve suelos en estudio.

Cuadro 3. Curvas de retención de fósforo, boro y azufre en Typic Dystrandepts de Costa Rica.

Nutrimentos	Cantidades agregadas $\mu\text{g/ml}$	Cantidades extraídas en cada suelo $\mu\text{g/ml}$								
		Dos Ríos	Santa María	Bijagua	La Laguna	Monteverde	Zarcelero	Sabalito	Agua Buena	Corredores
FOSFORO	0.0	1.0	0.0	2.0	2.0	2.0	0.0	1.0	1.0	3.0
	17.5	1.0	0.0	3.0	4.0	1.5	1.0	1.5	2.0	4.0
	35.0	1.0	0.5	4.0	6.0	3.0	2.0	2.0	4.0	5.5
	70.0	4.0	1.5	4.5	11.0	5.5	5.0	4.0	5.5	7.5
	140.0	6.5	4.5	6.5	16.0	12.0	9.0	8.0	12.0	12.5
	210.0	10.0	10.0	10.5	31.0	—	10.5	13.0	18.0	19.0
	280.0	16.0	13.0	14.0	51.0	32.0	25.0	19.0	25.0	26.0
	350.0	18.0	19.0	17.0	62.0	37.0	35.0	25.0	30.0	32.0
	420.0	25.0	24.0	21.5	79.0	51.0	43.0	32.0	37.0	38.0
	560.0	35.5	35.0	29.0	+100.0	72.0	58.0	42.0	52.0	51.0
700.0	44.0	43.0	38.0		87.0	73.0	52.0	60.0	62.0	
BORO	0	0.00	0.00	0.00	0.02	0.24	0.00	0.04	0.40	0.56
	1	0.04	0.04	0.02	—	0.50	0.04	0.08	0.78	0.34
	2	0.04	—	0.08	0.24	0.66	—	—	0.60	0.76
	5	0.22	0.08	0.08	0.56	1.24	0.04	0.20	0.66	0.94
	10	0.56	0.50	0.28	1.02	1.72	0.86	—	0.46	2.00
	20	1.30	0.70	1.30	1.60	+2.00	1.64	1.84	1.30	+2.00
AZUFRE	0	10.0	16.0	8.0	8.5	9.5	6.0	9.5	3.0	11.5
	10	15.0	18.0	11.0	—	12.0	10.0	10.0	4.0	14.0
	20	16.5	20.5	12.0	16.0	17.0	14.0	11.0	7.0	17.0
	50	19.0	26.5	17.0	27.0	24.0	23.0	14.0	12.0	23.5
	100	23.0	34.0	26.0	39.0	36.5	26.0	21.0	19.5	32.5
	200	31.5	+40.0	36.5	+40.0	+40.0	28.0	26.0	32.5	+40.0

Laboratorio de Suelos, MAG, Costa Rica.

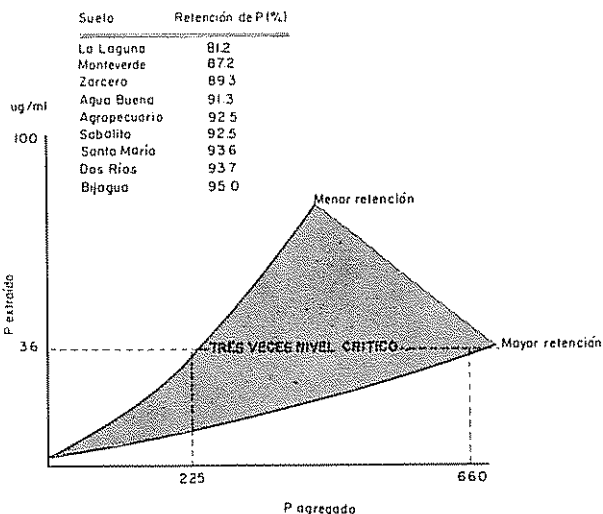


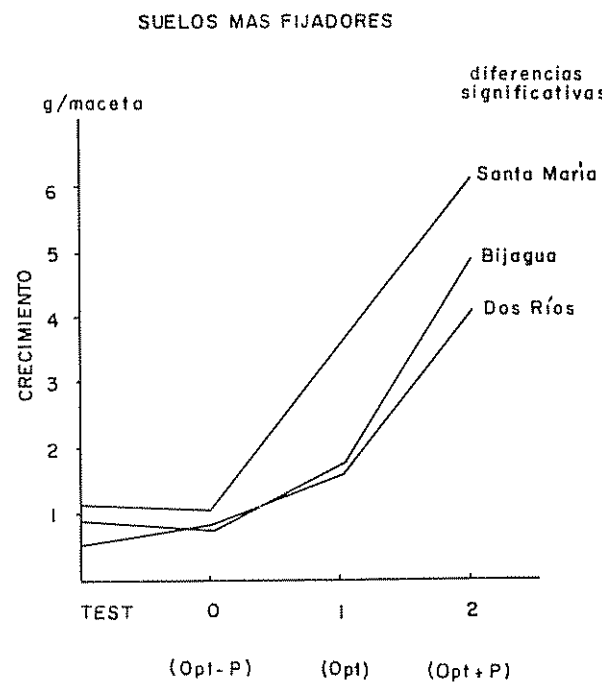
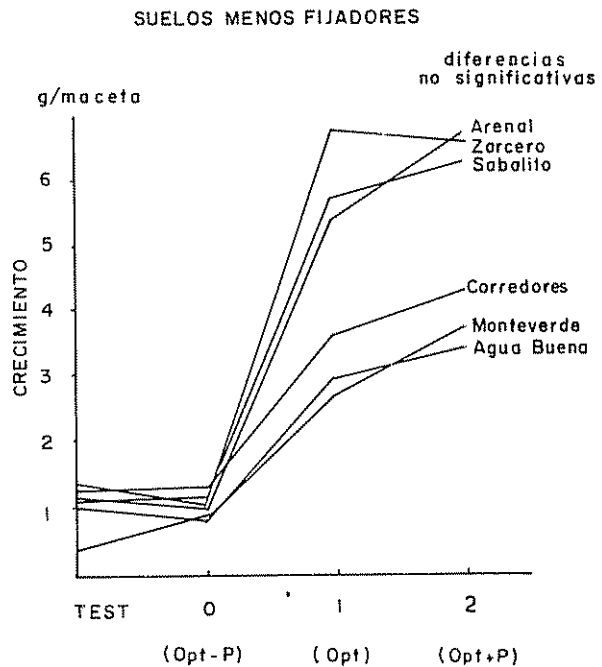
Fig 1. Ambito \square y porcentaje de retención de P en Typic Dystrandepts de Costa Rica. (Índice de regresión lineal (r) entre los nueve suelos = 0.88). % de retención de P = 100 (1-pendiente).

De acuerdo al crecimiento que alcanza el sorgo en los diferentes tratamientos en el invernadero, el único problema común y de características severas que se manifiesta en todos los suelos es la deficiencia de P. Este problema se debe a la gran capacidad de retención que desarrollan estos suelos por la calidad de los materiales coloidales que constituyen su complejo de cambio, especialmente alofanas (7).

Al comparar las respuestas en crecimiento a 0, 1 y 2 dosis de P (siendo una dosis de P la cantidad necesaria en cada suelo para extraer 36 $\mu\text{g/ml}$ de P con una solución de Olsen modificada) la mayoría de los suelos no manifiestan diferencia significativa entre una y dos dosis; sólo tres suelos lo hacen (Dos Ríos, Bijagua y Santa María) (Figura 2).

Como se puede apreciar en la Figura 2, entre el tratamiento testigo y el tratamiento sin P pero con otros elementos adicionados no hay diferencias en el crecimiento. Esto reafirma que la aplicación de P es fundamental para obtener respuesta a la adición de otros elementos. La aplicación de una dosis de P causa crecimientos de 2 a 5.5 veces más altos que los del testigo absoluto.

Los suelos que responden significativamente a la doble dosis de P son los tres de la Cordillera de Guanacaste. Este resultado concuerda con el obtenido a partir de los estudios de retención que señalan para estos suelos las retenciones más altas (más de 93% de retención y adiciones superiores a 500 $\mu\text{g/ml}$ de P para extraer tres veces el nivel crítico).



TEST = suelo sin fertilizar. 0 = lo mismo que el óptimo menos P. 1 = óptimo. 2 = lo mismo que el óptimo más otro tanto de P.

Fig. 2. Tendencias de crecimiento, en g de peso seco/maceta, en Typic Dystrandepts de Costa Rica, frente a 0, 1 y 2 dosis de P.

Solo un suelo mostró deficiencia y otros tres respondieron moderadamente a la aplicación de N. Esta observación no representa la situación agrícola comúnmente observada debido a que los suelos en estudio no están bajo uso intensivo. El efecto quizá se deba a un mejor acondicionamiento para el desarrollo de los microorganismos que se da en los suelos con alto contenido de materia orgánica debido a las condiciones de invernadero (secado-humedecimiento, temperatura, etc.) (14). Al ser el P el elemento más limitante no sólo para las plantas sino también para los microorganismos, esta reacción de mineralización se ve particularmente acelerada al suplir el nutrimento al suelo. Sin embargo, este efecto no será permanente y aplicaciones de P a nivel de campo pueden llevar a un agotamiento de la fuente primaria de N, en cuyo caso su aplicación se hará necesaria (17).

A pesar de la alta retención de B y S en los suelos alofánicos, parece que cuando otras condiciones son óptimas (suplemento adecuado de P y cuidados de invernadero), sus efectos sobre la producción no son tan sensibles. En la prueba biológica sólo dos suelos respondieron en forma significativa al S y ninguno de los nueve lo hizo al B.

Dado que la deficiencia de B ocurre principalmente en épocas de poca lluvia y en forma temporal (12), las probabilidades de encontrarla bajo las condiciones óptimas del experimento, fueron mínimas. En Costa Rica, los problemas de B en suelos volcánicos se han encontrado principalmente en café (6), cítricos y otros cultivos perennes, lo que demuestra la influencia del tipo de planta sobre la utilización eficiente de este elemento.

En el caso del S, las cantidades disponibles son altas (más de 13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de S, a excepción del suelo Agua Buena, que es uno de los que responde), y se vieron favorecidos aún más con el S orgánico liberado al fomentarse la mineralización con la adición de P. Es posible, sin embargo, que las deficiencias de S comiencen a aparecer cuando las fertilizaciones con P sean constantes, ya que la competencia entre aniones por los puntos de absorción le da la ventaja al fosfato, promoviendo el lavado de sulfatos (5, 20).

Únicamente en el suelo Bijagua, proveniente de la Cordillera de Guanacaste, se notó respuesta al Mo.

Conclusiones

Los nueve Typic Dystrandeps estudiados son semejantes cualitativamente en el comportamiento nutricional de los aniones.

La deficiencia de P es el problema limitante fundamental, y en términos prácticos, el único bajo condiciones de invernadero. Ningún otro problema de aniones se comprueba en más de un 40% de los suelos, y cuando existe en algún suelo es en forma secundaria. La deficiencia de P ocurre por los altos porcentajes de retención que presentan los materiales alofánicos. En los suelos estudiados, estos porcentajes siempre son superiores a 80% y llegan hasta 95% (225-660 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de P adicionados, para extraer tres veces el nivel crítico de 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Los suelos de la Cordillera de Guanacaste son los más fijadores, y los tres responden a la doble dosis de P. Si no se agrega P, aunque se adicionen otros elementos, no se logran mejores crecimientos que en el suelo natural.

Cuadro 4. Resultados cualitativos de la prueba biológica (técnica del elemento faltante o aditivo) practicada en invernadero sobre Typic Dystrandeps de Costa Rica.

Nutrimentos	Suelos								
	Dos Ríos	Santa María	Bijagua	La Laguna	Monte-verde	Zarcero	Sabalito	Agua Buena	Corredores
Nitrógeno	A	A	A	<u>R</u>	A	<u>R</u>	<u>R</u>	<u>D</u>	A
Fósforo	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>D</u>
Boro	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Azufre	A	A	A	<u>R</u>	A	A	A	<u>D</u>	A
Molibdeno	A	A	<u>R</u>	A	A	A	A	A	A

A = adecuado, diferencia no significativa con respecto al óptimo según el peso seco y según otras variables, Prueba de Dunnett.

R = posible respuesta, diferencia no significativa con respecto al óptimo según el peso seco, pero diferencia significativa con respecto al óptimo según otras variables, Prueba de Dunnett.

D = deficiente, diferencia significativa con respecto al óptimo según el peso seco y según otras variables, Prueba de Dunnett.

La nutrición por N, muy ligada a la mineralización de la abundante materia orgánica presente, tiende a ser eficiente. Bajo condiciones de invernadero, es preferible favorecer la mineralización supliendo P, que suministrar N adicional.

Los estudios de retención muestran que, bajo condiciones de laboratorio, el B y el S se fijan en todos estos suelos, sin embargo, sus efectos sobre el crecimiento no son sensibles. Ocurre una retención de B entre 85-96% y una de S entre 70-91% (1.6-15.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de B y 84-264 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de S para extraer con $\text{CaH}_4(\text{PO}_4)_2$ tres veces el nivel crítico correspondiente).

La respuesta a Mo sólo se encontró en un suelo de la Cordillera de Guanacaste.

Las concentraciones de nutrimentos aniónicos en suelos Typic Dystrandeps de Costa Rica fluctúan, con un 90% de probabilidad estadística, en los siguientes ámbitos: P entre 1 y 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$, B entre 0.06 y 0.56 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y S entre 7 y 29 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Los contenidos de materia orgánica van desde 4.8 hasta 24.2%, y la concentración de P en el tejido foliar de sorgo desarrollado en el invernadero sobre estos suelos oscila entre 0.06 y 0.09%.

Resumen

En nueve Typic Dystrandeps de Costa Rica existe semejanza cualitativa en el comportamiento nutricional de los elementos aniónicos. En estos suelos bajo condiciones de invernadero, la deficiencia de P es el problema limitante fundamental, y en términos prácticos, el único. Los porcentajes de retención de P fluctúan entre 80 y 95% (adiciones de 225-660 $\mu\text{g P}/\text{ml}$ para extraer con solución Olsen modificada tres veces el nivel crítico de 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$), correspondiendo los más altos a los suelos de la Cordillera de Guanacaste (más de 93% de retención). Cuando no se agrega P, aunque se adicionen otros elementos, el crecimiento es estadísticamente igual al del suelo natural. Todos los suelos responden significativamente al P en relación directa a su fertilidad natural.

La nutrición por N, muy ligada a la mineralización de la abundante materia orgánica presente (entre 4.8 y 24.2%), tiende a ser eficiente. En estos suelos, en invernadero, es preferible favorecer la mineralización supliendo P que suministrar N adicional. Bajo condiciones de laboratorio, el B y el S se fijan en todos los suelos, sin embargo, sus efectos sobre el crecimiento no son sensibles. La retención de B oscila entre 85 y 96% y la de S entre 70 y 91% (1.6-15.6 $\mu\text{g B}/\text{ml}$ y 84-264 $\mu\text{g S}/\text{ml}$ para extraer con $\text{CaH}_4(\text{PO}_4)_2$ tres veces el nivel crítico correspondiente). La respuesta a Mo solo se encontró en un suelo de la Cordillera de Guanacaste.

La concentración de P en Typic Dystrandeps de Costa Rica fluctúa entre 1 y 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$, la de B entre 0.06 y 0.56 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y la de S entre 7 y 29 $\mu\text{g}/\text{ml}$, con un 90% de probabilidad estadística. La textura de todos los suelos tiende a ser franca. La concentración de P en el tejido foliar de sorgo desarrollado en el invernadero sobre estos suelos oscila entre 0.06 y 0.09%.

Literatura citada

1. ALVARADO, A. Fertilidad de algunos andepts dedicados a potreros en Costa Rica. Turrialba 25(3):265-270. 1975.
2. BERTSCH, F., CORDERO, A. y ALVARADO, A. Fertilidad de Typic Dystrandeps de Costa Rica. I. Metodología, acidez y cationes (Ca, Mg, K, Fe, Mn, Zn, Cu). Turrialba 34(2):187-198. 1984.
3. BINGHAM, F. T. y PAGE, A. L. Specific character of boron adsorption by an amorphous soil. Soil Science Society of America Proceedings 35(6):892-893. 1971.
4. BIRRELL, K. S. Some properties of volcanic ash soils. In Meeting on classification and correlation of soils from volcanic ash, Tokyo, 1964. (Technical papers). FAO. World Soil Resources Reports No. 14. 1964. pp. 74-81.
5. BLASCO, M. Contenido y metabolismo del azufre en suelos volcánicos de Centro América. In Panel sobre Suelos Volcánicos de América, 2o. Pasto, Colombia, 1972. (Trabajos presentados) IICA. Serie Informes de Conferencias, Cursos y Reuniones No. 82. 1972. pp. 107-123.
6. CAMPOS, C. F. Nutrición mineral. In Costa Rica. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Departamento de investigaciones en café; treinta años al servicio de la caficultura costarricense. San José, MAG, Dirección de Investigaciones Agrícolas, 1980. p. 3.
7. FASSBENDER, H. W. Estudio de fósforo en suelos de América Central. IV. Capacidad de fijación de P y su relación con características edáficas. Turrialba 18(4):497-505. 1969.
8. FOX, R. L. Examples of anion and cation adsorption by soils of Tropical America. Tropical Agriculture (Trinidad) 51:200-210. 1974.

- 9 GEBHARDT, H y COLEMAN, N. T. Anion adsorption by allophanic tropical soils III Phosphate adsorption. Soil Science Society of America Proceedings 38(2):263-266. 1974
- 10 GUERRERO, J. I. Influencia de la materia orgánica y materiales amorfos en la CIC de algunos suelos de la región del Volcán Irazú Tesis Mag Sc Turrialba, Costa Rica, IICA, 1974 138 p.
- 11 JIMENEZ, J. R. Particularidades pedogenéticas en cuatro andepts de Costa Rica. Tesis Ing Agr San José, Universidad de Costa Rica, Facultad de Agronomía, Escuela de Fito-tecnia, 1979 70 p
- 12 LUZURIAGA, C. Propiedades morfológicas, físicas y químicas, y clasificación de seis andosoles de Costa Rica. Tesis Mag Sc Turrialba, Costa Rica, IICA, 1970 159 p
- 13 MALDONADO, F. A. Study of a climo-topo-sequence on soils developed on volcanic ash deposits in Ecuador. Tesis Ph D State University of Ghent-Belgium, 1973. 262 p.
- 14 MUNEVAR, F y WOLLUM II, A. G. Effects of the addition of P and inorganic N on carbon and nitrogen mineralization in andepts from Colombia. Soil Science Society of America Journal 41(3):540-545. 1977
- 15 MUNNS, D. N y FOX, R. L. The slow reaction which continues after phosphate adsorption: kinetic and equilibrium in some tropical soils. Soil Science Society of America Journal 40(1):46-51 1976.
- 16 PARFITT, R. L. Allophane in New Zealand soils In Soils with variable charge conference. New Zealand, Programme and Abstracts Palmerston North, 1981 30 p
- 17 PINEDA, J. R. Mineralización de N orgánico en algunos suelos de Costa Rica Tesis Mag. Sc Turrialba, Costa Rica, IICA. 1969 79 p.
- 18 RAJAN, S. S. S Adsorption and desorption of sulfate and charge relationship in allophanic clyas. Soil Science Society of America Journal 43(1):65-69 1979.
- 19 RAJAN, S. S. S y WATKINSON, J. H Adsorption of selenite and phosphate on allophane clay Soil Science Society of America Journal 40(1):51-54 1976
- 20 VALVERDE, E., BORNEMISZA, E y ALVARADO, A. Disponibilidad del azufre en algunos suelos del Atlántico norte de Costa Rica. Agronomia Costarricense 2(2):147-155. 1978

Reseña de libros

SHUTTON, S. L., WHITMORE, T. C. y CHADWICK, A. C. (eds.) *Tropical Rain Forest: Ecology and Management*. Blackwell Scientific Publications. Special Publication Series of the British Ecological Society No 2 1983. 498 p

Este libro es una recopilación de los trabajos presentados en el simposio que tuvo lugar en la Universidad de Leed en Easter, Reino Unido en 1982, con motivo de la celebración del vigésimo primer aniversario del establecimiento del Grupo de Ecología Tropical de la Sociedad Británica de Ecología

La publicación refleja el marcado interés que existe entre los ecólogos por el estudio y la conservación de los ecosistemas forestales tropicales, así como por el desarrollo de sistemas de ordenamiento que permitan un uso racional de estas comunidades. Al simposio asistieron un selecto grupo de ecólogos ingleses y norteamericanos y unos pocos de los países tropicales. Los temas tratados fueron muy diversos, algunos generales como es el estudio de la estructura tridimensional del bosque tropical, otros más específicos como el análisis de los escarabajos y otros insectos de los doseles del bosque en Manaus, Brasil. La mayoría de los trabajos tratan de mostrar el estado del conocimiento sobre el tema tratado, con indicación de los aspectos que todavía necesitan mayor investigación. Algunos de ellos, los más específicos, incluyen también descripciones de la metodología.

El libro está dividido en las siguientes secciones y subsecciones:

I -- Aspectos de la estructura y diversidad de la comunidad

IA—Vegetación y diversidad florística.

IB—Animales, principalmente insectos.

IC—El mantenimiento de la diversidad.

II -- Interacciones entre plantas y animales

III -- Descomposición de materia orgánica y ciclos de nutrimentos minerales.

IV -- Manejo de recursos.

IVA—Consideraciones biológicas.

IVB— Uso de "monitores" en los trópicos.

IVC— Informes regionales.

IVD— Aspectos generales.

La última sección, que trata del manejo de los recursos del bosque tropical, se fundamenta mucho en el conocimiento básico que se discute en las secciones anteriores. Hay dos trabajos que considero necesario comentar: "La dinámica ecológica de los fragmentos del bosque tropical" y "Conservación de áreas naturales en América Central. En el último de estos trabajos, preparado por G. S. Hartshorn, se presenta un análisis bastante completo sobre los principales ecosistemas forestales de la América Central que están bajo algún sistema de protección y de manejo, con cierto hincapié en el Sistema de Parques Nacionales y de Reservas Equivalentes de Costa Rica, considerando como un ejemplo en la América Latina. Sin embargo, es lástima que dicho autor no se refiera a la idea que algunos investigadores costarricenses han desarrollado con miras al establecimiento de un sistema de pequeñas reservas naturales de importancia para la conservación del ambiente físico y de la biota en zonas muy deforestadas, como el Valle Central de Costa Rica, y las regiones montañosas aledañas. Precisamente, el otro trabajo arriba citado, de T. Lovejoy *et al.*, trata sobre este tema de remanentes de bosques, en la Amazonia brasileña. Es de esperar que en el futuro se le de mayor importancia al estudio de estas pequeñas reservas, por su interés biológico, económico y cultural.

Sin lugar a dudas, el material presentado en este libro es de sumo interés para los estudiosos de la ecología y del uso racional del bosque tropical, por la actualización que se hace de los temas tratados por las personas que se encuentran activamente involucradas en la investigación de las comunidades forestales tropicales.

LUIS A. FOURNIER O.
ESCUELA DE BIOLOGIA
UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

ESTUDO MORFO-ANATOMICO DAS SEMENTES E PLANTULAS DE *Eucalyptus robusta* Sm.¹

C. M. BELTRATI*

Resumen

Los aspectos morfológicos y anatómicos de las semillas y plántulas jóvenes de Eucalyptus robusta Sm. fueron estudiados en detalle. Se hicieron también algunas observaciones de los tipos de óvulos a partir de los cuales se desarrollan las semillas fértiles y estériles

Introdução

Com o estudo de *Eucalyptus robusta* Sm., se continuam trabalhos anteriores relativos à morfologia e anatomia das sementes de diferentes espécies de *Eucalyptus* L'Herit cultivadas no Brasil, já citados (2). Visamos não só fornecer bases para a identificação desta espécie, nas fases de semente e plântula, como também observar os tipos de óvulos, dos quais provêm as sementes férteis e estéreis que caracteristicamente ocorrem em diferentes espécies do gênero

Na literatura, se encontram apenas os trabalhos de Zucconi (9) sobre *E. camaldulensis* Dehn e Gauba e Pryor (4), com *E. microcorys* F. Muell, que mencionam o assunto.

Material e métodos

O material utilizado no presente trabalho consistiu de botões florais, flores abertas, frutos novos, frutos maduros e sementes de *Eucalyptus robusta* Sm. provenientes de Horto Florestal "Navarro de Andrade", de Rio Claro (SP), colhidos de matrizes selecionadas

O material foi, em parte examinado a fresco e, em parte, fixado em FAA 50 (7) para estudo posterior

¹ Recebido para publicação em 12 de junho de 1983.

* Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" – Departamento de Botânica – Instituto de Biociências – Rio Claro, SP – Brasil

As determinações do peso de 100 sementes férteis bem como a porcentagem média de sementes estéreis (em peso), foram feitas através de amostras casuais, em balança analítica. Verificou-se, também, o número médio de sementes férteis por grama de sementes misturadas. Para determinação das dimensões médias das sementes foi utilizada uma ocular de medição aferida com lâmina micrométrica.

Para as observações e ilustrações foram utilizados microscópio óptico e esteriomicroscópio, ambos providos de câmara clara.

Os estudos anatómicos foram feitos através da observação de seções transversais, longitudinais e paradermicas das diferentes estruturas, realizadas a mão livre, sob esteriomicroscópio

Os cortes foram montados em glicerina a 10% , conseguindo se preparações semi-permanentes (8)

Para os testes histoquímicos os cortes de material fresco foram submetidos a corantes e reagentes específicos (1)

Para observação dos aspectos morfológicos da germinação, as sementes foram colocadas em placas de Petri, sobre papel de filtro úmido em condições de luminosidade e temperatura ambientais (média de 26°C)

A terminologia adotada na descrição das sementes segue Corner (3).

Resultados

Em *Eucalyptus robusta*, as amostras estudadas continham sementes aparentemente viáveis, providas de embrião e dois tipos de sementes estéreis, que foram designados A e B. Esses dois tipos, desprovidos de embrião, podem ser distintos pela forma, dimensões e coloração.

A porcentagem média (em peso) de sementes estéreis foi de $94 \pm 3\%$, havendo em média 94 ± 19 sementes férteis por grama de sementes misturadas. O peso médio de 100 sementes férteis foi de 34.6 ± 3.0 mg.

Características das sementes férteis (Figuras 1 a 3): sementes anátropas, de formas, em geral, poliédricas; às vezes cúbicas, trapezoidais; coloração marrom médio; superfície pouco brilhante, marcada por finíssimas estrias transversais; bordo liso; asa rudimentar, muito estreita, ao longo das arestas; hilo basal, circular, de coloração pouco mais clara que o restante da testa; micrópila visível externamente na semente seca, abaixo do hilo, como uma pequena abertura no centro de uma mancha escura; região da chalaza marcada por mancha circular escura; rafe como longa faixa que se estende do hilo até a chalaza; anti-rafe uniforme. Medem em média 1.29 ± 0.16 mm de comprimento por 0.83 ± 0.12 mm de largura.

Características das sementes estéreis (Figuras 4 e 5): **Tipo A** – alongada; cilíndrica, falcada, cônica; coloração marrom médio, avermelhado; superfície pouco brilhante; hilo basal; medindo em média 1.78 ± 0.40 mm de comprimento por 0.54 ± 0.08 mm de largura.

Tipo B – achatada; trapezoidal, falcada, cônica; cor marrom médio, amarelado; superfície pouco brilhante, hilo basal; medindo em média 1.10 ± 0.17 mm de comprimento por 0.63 ± 0.14 mm de largura.

Origem e estrutura das sementes férteis e estéreis: Examinando-se botões florais e flores de *Eucalyptus robusta*, observou-se ser o ovário infero, envolvido pelo receptáculo floral; tricarpelar e trilobular, com placentação axial (Figuras 12 e 13).

Cada lóculo contém grande número de óvulos que, na cavidade ovariana propriamente dita, se inserem perpendicularmente ao eixo longitudinal da placenta e são do tipo anátropo típico, enquanto que no cone apical do ovário, vão assumindo posição paralela a esse eixo (Figura 12), sendo também anátropos, porém atípicos.

Os óvulos anátropos típicos são crassinucelados e apresentam dois tegumentos biestratificados. Apresentam três cutículas bem distintas: a externa, cobrindo a superfície, a mediana, entre os dois tegumentos e a interna entre o tegumento interno e o nucelo (Figura 16). A micrópila é delimitada por ambos os tegumentos (Figura 14). No interior do funículo observa-se um pequeno feixe vascular que termina na região da chalaza (Figura 15).

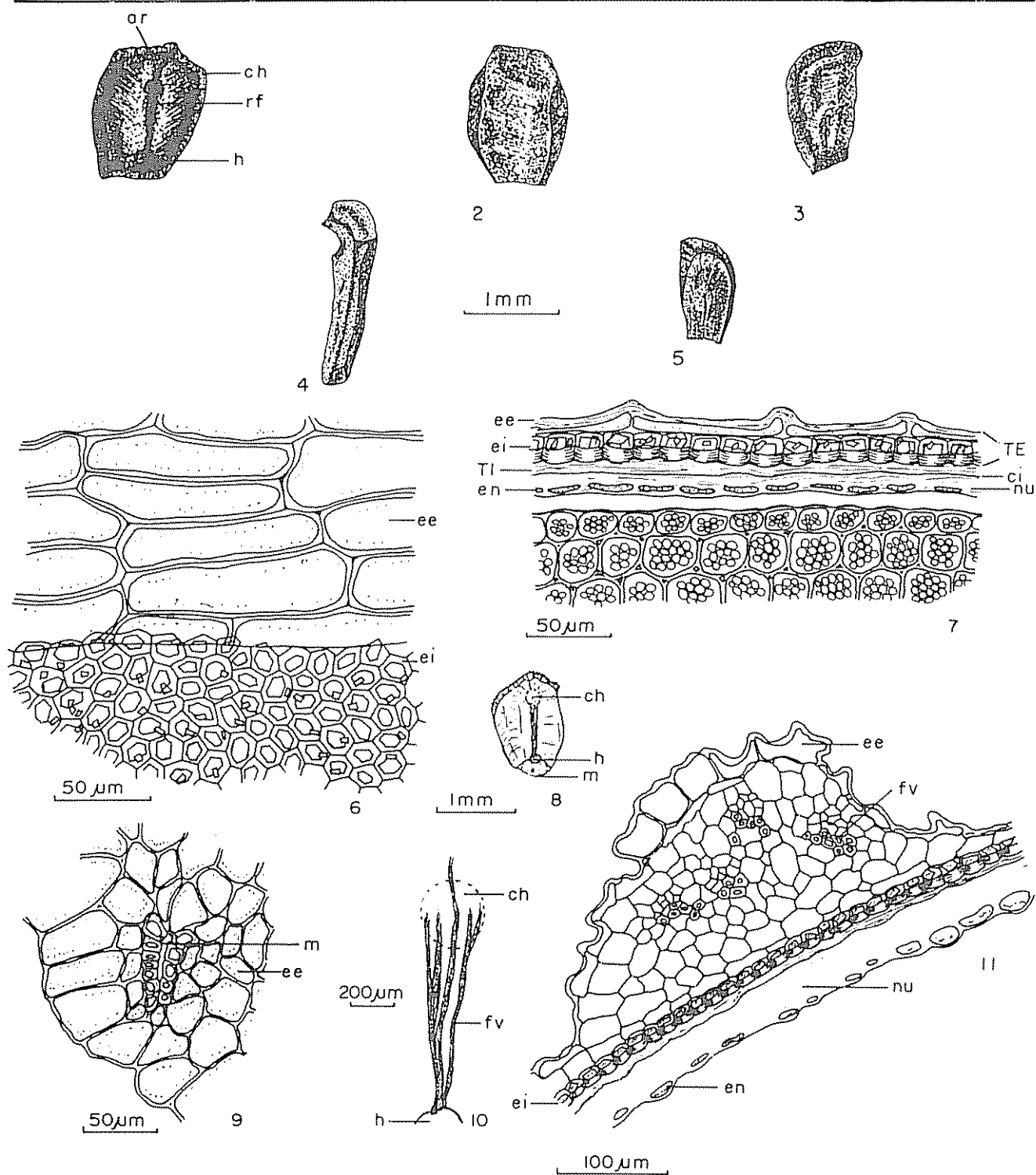
Os óvulos atípicos (Figuras 17 e 18) são muito alongados longitudinalmente, prismáticos, com micrópila basal, de difícil observação (Figura 19). São constituídos por apenas um tegumento, em sua maior parte biestratificado e o longo funículo, que contém um feixe vascular. As células da epiderme externa do tegumento são alongadas perpendicularmente à superfície e, a epiderme interna consta de pequenas células cúbicas que delimitam uma estreita cavidade vazia, alongada transversalmente que se estende do ápice até a base do óvulo, onde se comunica com a micrópila.

Observando-se frutos novos e desenvolvidos, verificou-se que os óvulos atípicos transformam-se em sementes estéreis do tipo A. Estas consistem apenas da epiderme externa, a qual apresenta células alongadas perpendicularmente à superfície, com paredes radiais e externas fortemente espessadas e lignificadas (Figuras 20, 21 e 23) do mesmo modo que o tecido subepidérmico que envolve o pequeno feixe vascular (Figuras 21 e 22). O embrião e o endosperma estão ausentes.

Os óvulos anátropos típicos podem desenvolver-se tanto em sementes férteis como em sementes estéreis do tipo B. Foram observadas, em geral, apenas uma ou duas sementes férteis por lóculo e, sua localização varia, podendo ser mediana ou basal, isto é, no fundo da cavidade.

Os óvulos anátropos típicos, não fecundados ao que tudo indica, desenvolvem-se em sementes estéreis do tipo B, cuja forma anátropa é bem evidente. Suas características histológicas assemelham-se às observadas nas sementes estéreis do tipo A.

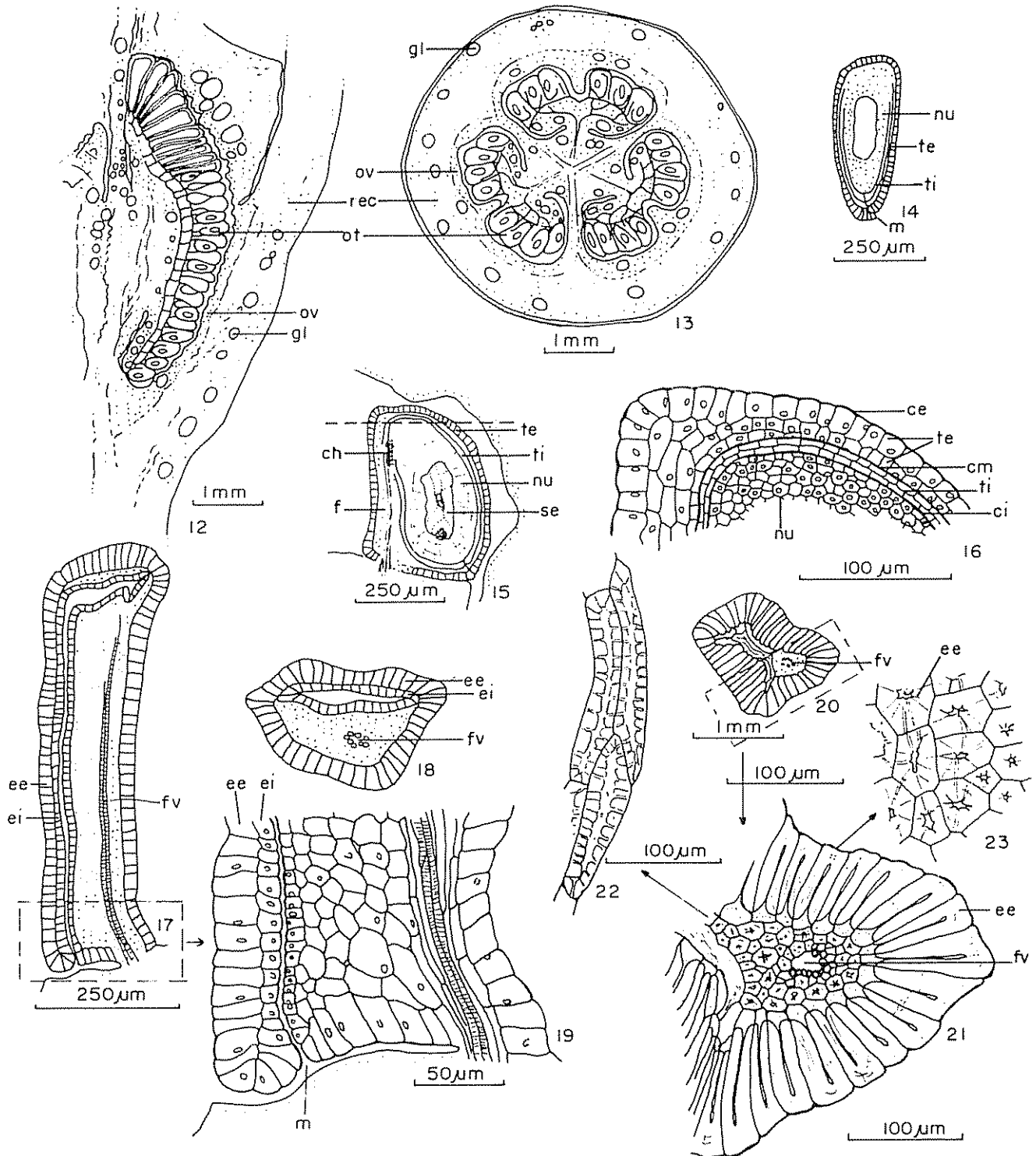
A semente fértil madura tem como envoltórios dois tegumentos, remanescentes do nucelo e do endosperma. O embrião (Figuras 22 e 23) consta de 2 cotilédones espessos, dobrados, inseridos próximo ao ápice do eixo hipocótilo-radícula (Figuras 26 e 27), entre os quais encontra-se o meristema caulinar. O eixo hipocótilo-radícula é cilíndrico e mede cerca de 0.9 mm de comprimento por 0.4 mm de diâmetro, havendo em sua extremidade inferior o meristema radicular e o caliptrógeno parcialmente envolvidos pelo órgão cupuliforme que é uma saliência basal do córtex do hipocótilo (Figura 26).



Figs. 1 a 5. Aspecto externo das sementes. Figuras 1 a 3 – semente fértil; Figura 4 – semente estéril tipo A; Figura 5 – semente estéril tipo B

Figs 6 a 11 Anatomia dos envoltórios da semente fértil. Figuras 6 e 7 – respectivamente seções paradérmica e transversal dos envoltórios da semente fértil (região da antirafe); Figura 8 – diagrama da semente mostrando a posição do hilo, da chalaza e da micrópila; Figura 9 – seção paradérmica na região micropilar; Figura 10 – padrão de vascularização; Figura 11 – seção transversal através da rafe.

(ar = asa rudimentar; ch = chalaza; ei = cutícula interna; e = embrião; ee = epiderme externa; ej = epiderme interna; en = endosperma; h = hilo; m = micrópila; nu = nucelo; rf = rafe; fv = feixe vascular; TE = testa; TI = tégmen)



Figs 12 e 13. Respectivamente diagrama das seções longitudinal e transversal do ovário envolvido pelo receptáculo floral

Figs 14 e 16 Óvulo anátropo típico. Figura 14 – diagrama da seção longitudinal transmediãna; Figura 15 – diagrama da seção longitudinal; Figura 16 – detalhe da região assinalada na Figura 15

Figs 17 a 19 Óvulo anátropo atípico. Figura 17 – diagrama da seção longitudinal; Figura 18 – diagrama de seção transversal; Figura 19 – detalhe da região assinalada na Figura 17

Figs 20 a 23 Semente estéril tipo A. Figura 20 – diagrama do corte transversal mediano; Figura 21 – detalhe da região assinalada na Figura 20; Figura 22 – seção longitudinal dos esclereídeos que envolvem o feixe vascular; Figura 23 – seção paradérmica da semente, passando pela epiderme externa

(ce = cutícula externa; ch = chalaza; ci = cutícula interna; cm = cutícula mediana; ee = epiderme externa; ei = epiderme interna; f = funículo; fv = feixe vascular; gl = glândula; m = micrópila; nu = nucelo; oa = óvulo anátropo atípico; ot = óvulo anátropo típico; ov = ovário; rec = receptáculo floral; se = saco embrionário; te = tegumento externo; ti = tegumento interno)

O tegumento externo ou testa (Figuras 6 e 7) na região da anti-rafe consta apenas de duas epidermes e constitui a camada pigmentada da semente. A epiderme externa consta de células tabulares, alongadas em sentido transversal, cujas paredes anticlinais externas são algo espessadas e côncavas, encostando-se parcialmente nas internas, fazendo desaparecer o lúmen. Ficam salientes apenas as paredes anticlinais, que constituem as estrias observadas na superfície da testa. Na região da rafe (Figura 11), observa-se um maior número de camadas de células parenquimáticas que envolvem o feixe vascular colateral que parte do hilo, ramifica-se e se estende até a chalaza (Figuras 8 e 10).

A epiderme interna consta de células retangulares em seção transversal (Figura 7) e pentagonais ou hexagonais, em seção paradérmica (Figura 6), cujas paredes periclinais internas são fortemente espessadas e cada célula contém um ou mais cristais de oxalato de cálcio.

Substâncias fenólicas de coloração marrom, aparecem dissolvidas no interior das células e impregnando as paredes celulares de testa.

O tegumento interno encontra-se quase que totalmente reabsorvido, sendo distinto apenas ao longo da rafe, onde podem ser observadas duas camadas de células, não muito nítidas.

As cutículas externa e mediana desaparecem na semente madura, ficando evidente apenas a interna, entre o tegumento interno e os restos do nucelo, os quais constituem um fino estrato.

Do endosperma resta uma única camada de células ricas em proteínas e gotículas de óleo (Figuras 6 e 11).

O tecido da chalaza é suberificado e suas células apresentam conteúdo denso, de natureza fenólica e de coloração marron-avermelhado.

A superfície do hilo é côncava, apresentando células de paredes finas, frequentemente rompidas. A micrópila (Figura 9) é uma pequena fenda rodeada por pequenas células de paredes mais espessas e as demais células, que rodeiam a abertura, apresentam conteúdo denso, de coloração marrom, bem escura.

A asa rudimentar é constituída pelos dois tegumentos, sendo que as células da epiderme externa apresentam-se perpendicularmente alongadas e a camada cristalífera forma uma dobra elevada, acompanhada pelo tegumento interno. A cutícula interna não se eleva.

O eixo hipocótilo-radícula (Figura 24) consta de protoderme, composta de células cúbicas, sob as quais se observam 7 a 8 camadas de células arredondadas do meristema fundamental, que deixam pequenos espaços intercelulares. Este ocorre no centro, como precursor de medula, rodeado por um cilindro procambial com 5 a 6 camadas de células estreitas e alongadas.

Na face adaxial do cotilédone (Figura 25), sob a protoderme, ocorre uma camada de células dispostas em paliçada e, a seguir 5 a 6 camadas de células que deixam pequenos espaços intercelulares.

Ao longo de todo o eixo hipocótilo-radícula aparecem, em formação, pequenas glândulas de óleo que ocorrem também, com menos frequência, em ambas as faces dos cotilédones.

Os tecidos do embrião, exceto o procâmbio e as células glandulares, são ricos em grãos arredondados de aleurona e gotículas de óleo.

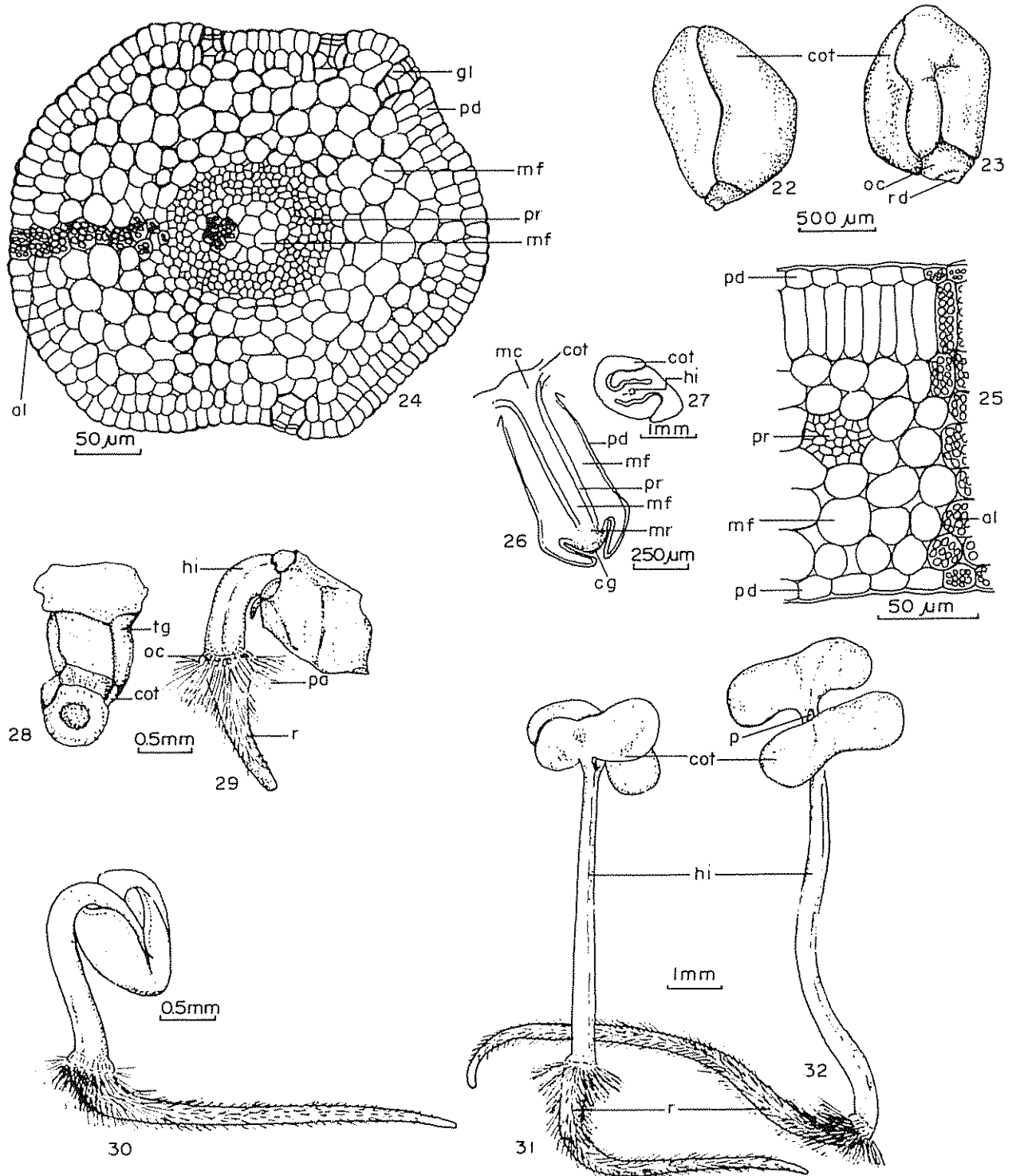
Germinação e caracteres morfológicos da plântula: Colocadas em condições favoráveis, as sementes embebem-se rapidamente e em 3 a 4 dias os tegumentos se rompem na região micropilar, emergindo a radícula, parcialmente envolvida pelo órgão cupuliforme (Figura 28). Este, depois de desenvolvido mede cerca de 0,1 mm de largura, sendo recoberto por densa coroa de longos pelos absorventes (Figura 29). Em 6 a 8 dias os tegumentos se desprendem (Figura 30) e o hipocótilo torna-se ereto, fixo ao substrato pelo órgão cupuliforme que se mantém funcional por cerca de 30 a 35 dias, ocasião em que começa a secar.

A raiz primária e o hipocótilo alongam-se rapidamente (Figuras 31 e 32) e os cotilédones desdobram-se em 12 a 13 dias, sendo verdes em ambas as faces e bilobados, observando-se entre eles, a plúmula. O hipocótilo é de seção quadrangular e adquire coloração rósea devido à presença de antocianinas em suas células epidérmicas. O epicótilo só inicia seu desenvolvimento após 20 a 25 dias.

Discussão

Entre as diferentes espécies de *Eucalyptus*, as características morfo-anatômicas das sementes variam, sendo importantes na determinação das espécies. Gauba e Pryor (4, 5, 6) ressaltam o valor taxonômico da estrutura dos tegumentos das sementes de muitas das espécies.

As sementes variam de anátropas a hemitropas e Corner (3) chamou a atenção para o fato de que esses tipos ainda não foram devidamente correlacionados com os tipos de óvulos dos quais provêm.



Figs 22 a 25 Embrião. Figuras 22 e 23 – aspecto externo do embrião; Figura 24 – seção transversal do eixo hipocótilo-radícula; Figura 25 – setor de seção transversal do cotilédone; Figura 26 – diagrama da seção longitudinal do eixo hipocótilo-radícula; Figura 27 – diagrama de seção transversal do eixo hipocótilo-radícula na região de inserção dos cotilédones

Figs 28 a 32 Estágios sucessivos de desenvolvimento da plântula, após a colocação das sementes em condições de germinação. Figura 28 – plântula após 4 dias; Figura 29 – plântula após 6 dias; Figura 30 – plântula após 8 dias; Figura 31 plântula após 11 dias; Figura 32 – plântula após 16 dias

(al = grãos de aleurona; cg = caliptrógeno; cot = cotilédone; gl = glândula em formação hi = hipocótilo; mc = meristema caulinar; mf = meristema fundamental; mr = meristema radicular; oc = órgão cupuliforme; p = plúmula; pa = pelos absorventes; pd = protoderme; pr = procâmbio; r = raiz primária; rd = radícula; tg = tegumentos)

Em *Eucalyptus microcorys* (4) há óvulos hemitropos que, se fertilizados, dão origem a sementes férteis e, em caso contrário, dão sementes estéreis do tipo B. Ao lado destes, ocorrem óvulos átropos, que originam as sementes estéreis tipo A. Em *E. robusta*, segundo observamos, as sementes tipo A provêm de óvulos anátropos atípicos. Resultado semelhante foi encontrado em *E. camaldulensis* Dehn. (9), em que foi verificado que óvulos fecundados podem degenerar no estado de zigoto ou em estágio mais desenvolvido, originando sementes estéreis. Desconhece-se, porém, a causa do fenômeno que foi atribuído ao patrimônio genético do indivíduo. Zucconi (9) observou que as sementes estéreis do tipo B encontram-se em posição intermediária entre as do tipo A, no ápice da cavidade ovariana e as férteis, no fundo do ovário. Em *E. robusta* essa constância não foi observada.

Summary

Morphological and anatomical aspects of seeds and seedlings of *Eucalyptus robusta* Sm. were studied in detail. The ovule types from which the fertile and sterile seeds are originated, were also examined.

Literatura citada

1. BELTRATI, C. M. Morphological and anatomical studies of the seeds and seedlings of *Eucalyptus pilularis* and *E. umbra*. *Revista de Biologia Tropical*, 29(2):185-195. 1981.
2. BELTRATI, C. M. Morfologia e anatomia das sementes e plântulas de *Eucalyptus intermedia* R. T. Baker. *Turrialba*, 32(3):301-308. 1982.
3. CORNER, E. J. H. The seeds of dicotyledons. Vol. 1. Cambridge. Cambridge University Press. 1976.
4. GAUBA, E. e PRYOR, L. D. Seed coat anatomy and taxonomy in *Eucalyptus*. I. Proceedings of the Linnean Society of New South Wales, 83(1):20-32. 1958.
5. GAUBA, E. e PRYOR, L. D. Seed coat anatomy and taxonomy in *Eucalyptus*. II. Proceedings of the Linnean Society of New South Wales, 84(2):278-291. 1959.
6. GAUBA, E. e PRYOR, L. D. Seed coat anatomy and taxonomy in *Eucalyptus*. III. Proceedings of the Linnean Society of New South Wales 86(1):96-111. 1961.
7. JOHANSEN, D. A. Plant Microtechnique. New York McGraw-Hill. 1940.
8. SASS, J. E. Botanical Microtechnique (2d. ed.). Ames, Iowa State College Press. 1951.
9. ZUCCONI, L. Organogenesi dei fiore ed embriologia in *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. *Publicazioni del Centro di Sperimentazione Agricola e Forestale* 2:59-86. 1958.

Reseña de libros

NILSON, S. Atlas of airborne fungal spores in Europe. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag 1983. 139 p (87 fotografías en microscopio electrónico y 10 figuras) Price \$ 53.40.

La ecología atmosférica cada vez despierta mayor interés en los especialistas, sobretudo por los problemas más dramáticos surgidos con la contaminación ambiental. Esto ha estimulado también las investigaciones sobre la población microbiana de significancia biológica, como contaminante del aire, especialmente las esporas de hongos. La población de estas en el aire en un momento determinado, es el resultado de procesos complejos, cada uno de los cuales es influenciado directa o indirectamente por factores externos principalmente climáticos que determinan la formación, liberación, transporte y deposición de las esporas. De ahí que es frecuente encontrar las mismas poblaciones de esporas de diferentes géneros de hongos, en un determinado ecosistema y lo que varía mayormente es la dinámica de esas poblaciones.

En los estudios epidemiológicos de interés fitopatológico de medición de poblaciones de esporas mediante trampas, los investigadores tienen dificultad para identificar visualmente las esporas, debido a que es más importante la conidiogénesis como criterio taxonómico. En unos pocos casos las esporas son reconocidas a nivel de especies.

De ahí la importancia de conocer los hongos localmente y tener buenas fotografías o figuras para comparación. En este sentido los atlas de esporas cumplen una función importante y el presente contiene descripciones e ilustraciones de esporas de 90 géneros-especies, tomadas tanto al microscopio corriente como electrónico de transmisión, presentes en ambientes especiales así como de hongos comunes en diversidad de ambientes de Europa.

El libro en su primera sección describe las características relevantes y ciclos de vida de las principales clases de hongos, así como definición de términos usados corrientemente en su taxonomía. Especial énfasis se hace en la ilustración de los diferentes tipos de conidiogénesis de hongos de la clase Deuteromycetes.

La terminología utilizada en la taxonomía de hongos es amplia y de difícil ubicación para el investigador en cuanto a su significado de ahí que el libro incluye un glosario de términos utilizados más frecuentemente en el texto. También contiene cuadros en los que se incluyen las esporas de hongos más frecuentes en diferentes microambientes.

El libro es de particular interés para aerobiólogos, fitopatólogos, micólogos, alergólogos o aquellos investigadores interesados en morfología de esporas.

EDGAR VARGAS G.
ESCUELA DE FITOTECNIA
UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

THE ABSORPTION OF MINERAL NUTRIENTS BY SWEET CORN SEEDLINGS (*Zea mays* L.) AS AFFECTED BY NITROGEN FERTILIZATION AND WATER STRESS¹

A. J. TESH^A*
P. ECK*

Resumen

Se estudió la absorción de N, P, K y Mg por plántulas de maíz sembradas en potes con diferentes niveles de H y cantidades de agua. En adición, se estudió la resistencia de los estomas, el potencial hídrico de las hojas y el contenido de humedad relativo.

Cuando los resultados se expresan como porcentaje de peso seco, los contenidos de N, P y K decrecieron con el aumento del déficit de humedad; sin embargo, el porcentaje de Mg aumentó significativamente. Si los datos se expresan como mg planta⁻¹, todos los nutrimentos estudiados menos el P aumentaron con el déficit de agua.

La adición de N tendió a incrementar la resistencia de los estomas en la superficie adaxial de las hojas y a disminuirla en la superficie abaxial. Así mismo, la fertilización con N disminuyó el potencial hídrico de la hoja y el contenido de humedad relativo en las plántulas bajo deficiencia de agua.

Introduction

The interaction between water utilization and mineral nutrition has been studied by various researchers, often with different results. It has been observed, for instance, that increasing transpiration also increases mineral absorption (10). It has also been suggested (14) that plants that have very low transpiration also have low photosynthesis and slow growth rate. Arnon (2) however, has cautioned against the notion that one cannot reduce transpiration without adversely affecting plant growth. All these workers tend to agree that there is a correlation between water use, nutrient uptake, and growth.

Radin and Parker (20) found that nitrogen deficient cotton plants (*Gossypium hirsutum* L.) had greater drought resistance than nitrogen-supplied plants. Their results did not support those of Holt

and Fisher (12) who reported that high levels of N helped Bermuda grass (*Cynodon dactylon*) to avoid water stress, partly by having deep roots. It has been shown that N-fertilization could be of great advantage in coffee seedlings (*Coffea arabica* L.) grown under water stress conditions (23) and that the absorption of nitrogen fertilizer is not affected adversely by water stress until the soil moisture is less than 50% field capacity (24).

In the present work the absorption of nitrogen, potassium, phosphorus and magnesium by sweet corn seedlings was studied in relation to different levels of fertilizer nitrogen and water stress conditions. In addition the stomatal resistance, the leaf water potential and the relative water content of the seedlings were studied.

Materials and methods

Seedling growth:

Seeds were grown in acid-washed sand in pots in the greenhouse. Each pot contained 1.5 kg of air-dry sand. Irrigation using tap water on alternate days was continued for 26 days. At this stage the seedlings had four leaves. Three levels of N were then applied

¹ Received for publication on May 5, 1983.

* Rutgers University, Cook College, New Brunswick, New Jersey 08903, USA. The present address of the senior author, to whom reprint requests should be sent, is Department of Botany, University of Dar es Salaam P. O. Box 35060, Dar es Salaam, Tanzania.

as: $N_1 = 56$ ppm, $N_2 = 140$ ppm and $N_3 = 252$ ppm. The other essential nutrients were added in the following amounts: $K = 4$ mM, $P = 1$ mM, $Ca = 2$ mM, $Mg = 2$ mM, $S = 4$ mM, $FeSO_4 \cdot 7H_2O = 5.98$ mg/l, $H_3BO_3 = 0.572$ mg/l, $MnCl_2 \cdot 4H_2O = 0.901$ mg/l, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O = 0.440$ mg/l, $CuSO_4 \cdot 5H_2O = 0.0393$ mg/l, and $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O = 0.252$ mg/l. Randomized complete block design was used, with each treatment replicated 3 times. Six sets of this kind were carried out simultaneously. Plant heights at this stage were found to be 4.9 ± 0.7 cm.

The nutrients were applied on alternate days at a rate of 100 ml kg^{-1} of air-dry sand, and continued for 20 days. By this time the seedlings were at the 8-9-leaf stage. One set of plants was harvested for dry weight determination. The remaining sets of plants were thoroughly irrigated with four volumes of 5 bar polyethylene glycol 6000 (PEG) in order to bring the osmotic potential to a relatively low value, and then the plants were left without further irrigation. One set of plants was left as a control and continued to receive normal irrigation with N_1 , N_2 , N_3 on alternate days.

At 2-days intervals stomatal diffusive resistance and plant tissue analysis for N, P, K, and Mg were measured on individual sets as water stress developed. After 8 days of stress, the final set was used for leaf water potential.

Leaf water potential

The leaf water potential was measured on either the third or fourth leaf (counting from top) using the pressure chamber method. Measurements were normally taken between 1400 hours and 1500 hours in order to limit the influence on water stress due to diurnal variations commonly observed in corn and other plants (1).

Relative water content (RWC)

The RWC was always measured around 1500 hours. Small leaf segments were cut from the middle portion of the 3rd leaf, immediately its area was measured and fresh weight (FW) taken. The segments were then floated on distilled water in covered Petri dishes arranged on a well illuminated table for at least 5 hours. They were then removed, wiped dry with soft tissue paper and weighed to obtain their saturated weight (SW). Then they were dried in an oven at 80°C and weighed again to obtain the dry weight (DW). The RWC was then calculate using the following formula (4).

$$\% \text{ RWC} = \frac{(FW - DW)}{(SW - DW)} \times 100$$

Stomatal diffusive resistance

Resistance to water vapour diffusion (stomatal diffusive resistance) was measured with a Li-Cor Autoporometer (Lambda Instruments Corporation, Lincoln, Nebraska). This was measured both on the upper (adaxial) and the lower (abaxial) and the lower (abaxial) sides of the leaf. The total leaf resistances were then calculated from the parallel resistances of the two sides. Measurements were always taken between 1400 hours and 1500 hours, the time when the temperature and light conditions are assumed to be maximum and the water potential minimum (20).

Results

The data in Figure 1 show the effects of N on leaf stomatal resistance measured before water stress was imposed. Here, high-N significantly ($P = 0.05$) increased stomatal resistance on the adaxial (upper) leaf surface but it lowered the resistance on the abaxial (lower) side somewhat. The overall resistance was found to be higher at high-N than at the other two levels.

Water stress lowered both the leaf water potential (Figure 2) and the relative water content (Figure 3). It can be seen that the water stressed plants and the controls were affected differently by N. In the control plants the lowest water potential was recorded in medium N while water stressed plants had the lowest values in high-N plants. The data for leaf water potential and RWC do not seem to suggest that the two are closely related. For example, medium-N plants in the control (without water stress) had relatively low leaf water potential (Figure 2) but had relatively high RWC (Figure 3).

Absorption of nutrients

At 2-days intervals as water stress developed, plant material was harvested for tissue analysis. All the aboveground portions of the plants were used (in subsequent sections this will be referred to simply as "plant").

Phosphorus (P), potassium (K) and magnesium (Mg) were determined as detailed by Steckel and Flannery (22) and the total nitrogen was determined by Kjeldahl's method as described by Bremner (5).

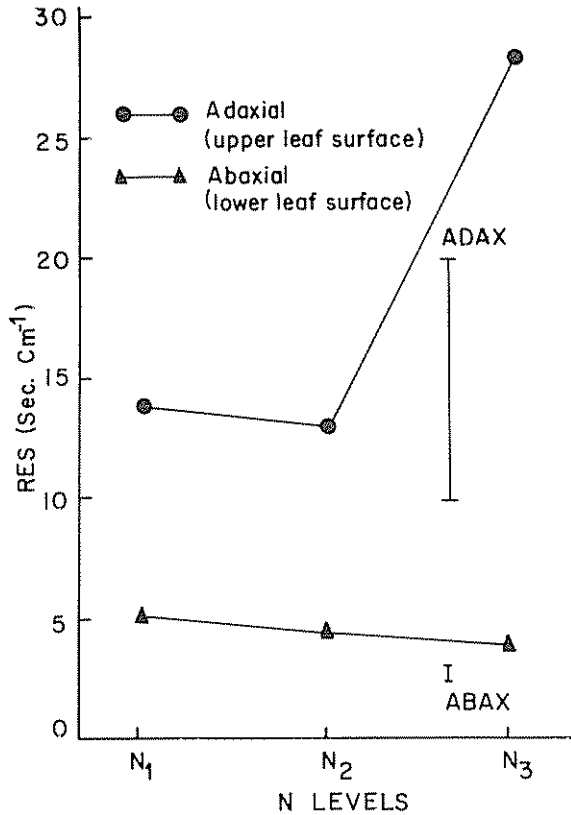


Fig. 1. Leaf stomatal resistance (Res) as affected by N fertilization. Measurements were taken for both the abaxial and the adaxial surfaces. Vertical line indicates the LSD at $P=0.05$.

The data in Tables 1, 2, 3 and 4 compare the values of tissue nutrients (N, P, K, Mg respectively) when expressed as % dry weight and when expressed as total amounts per plant. It can be seen (Table 1) that N fertilization increased N accumulation in plant tissue, both when expressed as % dry weight and when expressed as mg/plant. Water stress in this case reduced N accumulation in the plants in all the 3 levels of N applied. However, whereas water stress reduced tissue N as % dry weight, it increased the total N in the plant. This might be accounted for in terms of "dilution" caused by better growth where there was no water stress. The same trend was observed in the case of K (Table 3), but not for P (Table 2). The data for Mg (Table 4) show that water stress significantly increased tissue content both in terms of % dry weight and as total Mg per plant.

Discussion

The relationship between the major plant nutrients and water economy in plants has been studied for a long time (3), usually with varied results and/or

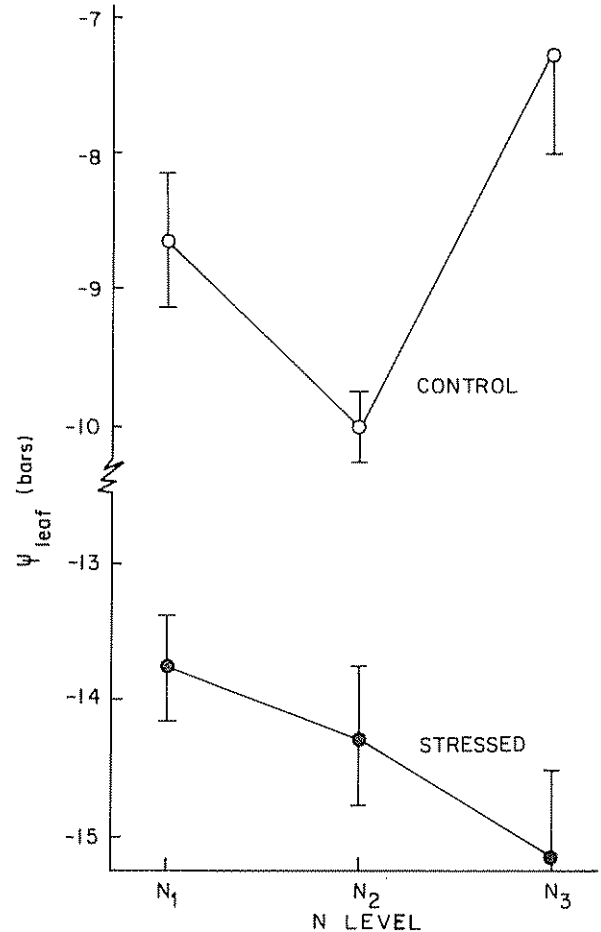


Fig. 2. The leaf water potential as affected by N fertilization. Vertical lines indicate the standard errors (SE) of the means.

interpretations. Brown (6), for instance, reported that N increased the water use efficiency of dryland wheat by an average of 56%. Other results (15), however, suggested that N fertilization accentuates the effects of dry summers. The variabilities reported might be attributed to such factors as the plant species (or even cultivars) used, the parameters measured, the age of the plants, and the actual amounts of the nutrients applied.

The results presented in Figure 1 show that the leaf diffusive resistance was not the same for the abaxial and the adaxial leaf surfaces. Whereas high N plants had high resistance on the adaxial surface they had a slightly reduced resistance on the abaxial surface. This behaviour could be of advantage in conserving water since it is known that high stomatal diffusive resistance reduces transpiration much more than it reduce CO_2 transfer (8, 18). Low water potential in plants is generally considered a sign of

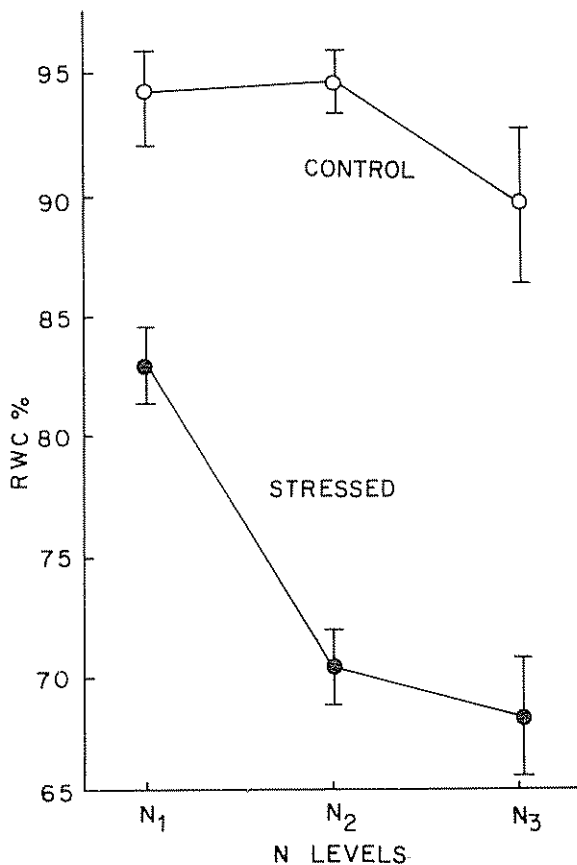


Fig 3 The relative water content (RWC) as affected by N fertilization and by water stress. The vertical lines indicate the standard errors (SE) of the means.

Table 1. Effects of N and water stress on tissue N as percentage (%) dry weight, and as mg plant⁻¹.

Treatment	N (%)	N (mg plant ⁻¹)
No Water Stress		
N ₁	3.54 ± 0.51	69.2 ± 13.9
N ₂	4.31 ± 0.73	114.8 ± 21.8
N ₃	4.79 ± 0.06	125.1 ± 43.1
6 days of water stress		
N ₁	1.97 ± 0.17	88.9 ± 1.1
N ₂	2.82 ± 0.17	126.0 ± 9.5
N ₃	3.83 ± 0.11	194.0 ± 10.3

LSD₀₅ for N (%) = 0.9

LSD₀₅ for N (mg plant⁻¹) = 38.46

Table 2. Effects of N and water stress on tissue P as percentage (%) dry weight, and as mg plant⁻¹.

Treatment	P (%)	P (mg plant ⁻¹)
No Water Stress		
N ₁	0.35 ± 0.09	6.68 ± 1.30
N ₂	0.39 ± 0.14	10.00 ± 0.21
N ₃	0.32 ± 0.17	10.93 ± 4.31
6 days of water stress		
N ₁	0.22 ± 0.02	10.11 ± 0.52
N ₂	0.20 ± 0.05	9.07 ± 2.19
N ₃	0.29 ± 0.03	14.86 ± 1.96

LSD₀₅ for P (%) means = 0.23

LSD₀₅ for P (mg plant⁻¹) means = 5.45

Table 3. Effects of N and water stress on tissue K as percentage (%) dry weight and as mg plant⁻¹.

Treatment	K (%)	K (mg plant ⁻¹)
No water stress		
N ₁	6.21 ± 0.53	123.30 ± 32.44
N ₂	5.67 ± 1.26	148.78 ± 18.34
N ₃	5.72 ± 0.78	145.13 ± 34.32
6 days of water stress		
N ₁	4.40 ± 0.34	199.13 ± 2.81
N ₂	4.40 ± 0.34	196.76 ± 21.23
N ₃	4.29 ± 0.00	217.07 ± 6.90

LSD₀₅ for K (%) means = 1.2

LSD₀₅ for K (mg plant⁻¹) means = 10.27

drought tolerance. This is, at least partly, due to the increased ability of low water potential plants to absorb water from low solute potential media (13). This was found to be the case in sweet corn seedlings (Figure 2).

In the experiments reported here (Table 1) it was clearly shown that as N was increased in the growing medium it also increased in the plant tissue, provided water supply remained the same. Similar results have been reported (7, 17). At the same time, water stress

significantly reduced tissue N (Table 1) and K (Table 3) and increased tissue Mg (Table 4), but it had variable effects on P (Table 2). These results differ in some respects from those reported by Richards and Wadleigh, as cited by Jenne (16). These authors reported that some evidence existed showing that decreasing soil moisture supply is associated with an increase in N percentage, a decrease in K percentage and a variable effect upon P. This discrepancy might be attributed to the differences in plant species used.

The data in Table 3 also shows that although water stress significantly reduced K uptake, N did not have any significant effect on K uptake. This is in contrast to the results reported by other workers (9) that high N may bring about K deficiency in some fruit plants. It has been suggested that the low levels of K, Ca, Mg often observed in high-N plants could be attributed to growth dilution. However, Palaniyandi and Smith (19) found that applied N did not depress leaf K concentration in snap beans although the vine weight more than doubled. Smith (21) found that applied N increased Mg concentration in snap beans and that K applications resulted in a reduction in the concentration of both Ca and Mg. These results were not confirmed in the present work (see Table 4). Here it was shown that water stress increased the percentage Mg in the tissue, but applied N did not increase tissue Mg significantly.

The total amounts of the nutrients ($\text{mg} \cdot \text{plant}^{-1}$) as affected by N and by water stress were also interesting. It can be seen (Table 1) that although water stress reduced % N in the tissue, the absolute

amount per plant actually increased. This shows that dilution due to growth must be taken into account. The same picture was observed for K (Table 3) but not for P. Mg increased about four fold with water stress when expressed at % dry weight, but it increased almost ten fold when expressed as total content per plant. This again shows the effect of growth dilution. Gates (11) working on tomato plants reported that N decrease in water stressed plants both when expressed as mg plant^{-1} and as % dry weight, but the relative decreases were different. Here again species variability may account for the differences.

Summary

The absorption of N, P, K and Mg by potted sweet corn seedlings was studied at different levels of applied fertilizer N and in relation to water stress. Stomatal resistance, leaf water potential and the relative water content were also studied.

When expressed as percentage dry weight the amounts of N, P, and K significantly decreased as water stress increased. However, tissue Mg (%) significantly increased with increasing water stress. On the other hand, when expressed as $\text{mg} \cdot \text{plant}^{-1}$, all the mineral nutrients analysed except P increased with increasing water stress.

Nitrogen tended to increase the stomatal resistance on the adaxial surfaces of the leaves while it decreased the resistance slightly on the abaxial leaf surfaces. At the same time nitrogen fertilization decreased the leaf water potential and the relative water content of water-stressed seedlings.

Table 4. Effects of N and water stress on tissue Mg as percentage (%) dry weight and as mg plant^{-1} .

Treatment	Mg (%)	Mg (mg plant^{-1})
No water stress		
N ₁	0.06 ± 0.08	1.04 ± 0.97
N ₂	0.06 ± 0.03	1.70 ± 0.70
N ₃	0.03 ± 0.03	0.95 ± 0.99
6 days of water stress		
N ₁	0.20 ± 0.06	8.96 ± 2.33
N ₂	0.25 ± 0.04	11.47 ± 3.15
N ₃	0.19 ± 0.01	9.44 ± 0.36

LSD₀₅ for Mg (%) means = 0.10.

LSD₀₅ for Mg (mg plant^{-1}) means = 7.53.

Literature cited

1. ACEVEDO, E., FERERES, E., HSIAO, T. C. and HENDERSON, D. W. Diurnal growth trends, water potential, and osmotic adjustment of maize and sorghum leaves in the field. *Plant Physiology* 64:476-480. 1979.
2. ARNON, I. Physiological principles of dryland crop production. In U.S. Gupta ed., *Physiological aspects of dryland farming*. Oxford and IBM publishing Co. 1975.
3. BLACK, C. A. Crop yields in relation to water supply and soil fertility. In Pierre, W. H., Kirkham, D., Pesek, J. and R. Shaw eds. *Plant environment and efficient water use*. Madison, Wisconsin. American Society of Agronomy. 1965.

4. BOYER, J. S. Relationships of water potential to growth of leaves. *Plant Physiology* 43: 1 056-1 062. 1968.
5. BREMNER, J. M. Nitrogen availability indexes. In Black, C.A. ed. *Methods of soil analysis*. Madison, Wisconsin, American Society of Agronomy 9:1 324-1 325.
6. BROWN, P. L. Water use and soil water depletion by dryland wheat as affected by nitrogen fertilization. *Transactions of the 7th International Congress of Soil Science* 63:43-46. 1972.
7. CANNON, I. F., CHADWICK, L. C. and REICH, K. W. Nitrogen and potassium nutritional studies of *Cleditsia triacanthos* "Moraine". *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* 75:693-699. 1960.
8. COWAN, I. R. and TROUGHTON, J. H. The relative role of stomata in transpiration and assimilation. *Planta (Berl.)* 97:325-336. 1971.
9. FORSHEY, C. A. and WAYNE MCKEE, M. Effects of potassium deficiency on nitrogen metabolism in fruit plants. *Journal of American Society of Horticultural Science* 95: 727-729. 1970.
10. FREELAND, R. O. Effect of transpiration upon absorption of mineral salts. *American Journal of Botany* 24:373-374. 1937.
11. GATES, C. T. The response of the young tomato to a brief period of water shortage. III. Drifts in nitrogen and phosphorus. *Australian Journal of Biological Science* 10:125-146. 1957.
12. HOLT, E. C. and FISHER, F. L. Root development of coastal Bermuda grass with high nitrogen fertilization. *Agronomy Journal* 52:593-596. 1960.
13. HSIAO, I. C., ACEVEDO, E. and FERERES, E. Stress metabolism, water stress, growth, and osmotic adjustment. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*. 273:479-500. 1976.
14. HYGEM, G. Studies in plant transpiration. *Physiologia Plantarum* 6:106-133. 1953.
15. HYDER, D. N., HOUSTON, W. R. and BURWELL, J. B. Drought resistance of blue grana as affected by atrazine and N fertilizer. *Journal of Range Management* 26:214-216. 1976.
16. JENNE, E. A., RHOEDES, H. F., YIEN, C. H. and HOWE, O. W. Changes in nutrient element accumulation by corn with depletion of soil moisture. *Agronomy Journal* 50:71-74. 1958.
17. KELLEY, J. D. Nitrogen and potassium rate effects on growth, leaf nitrogen and winter hardiness of *Pyracantha coccinea* "Lalandi" and *Ilex crenata* "Rotundifolia". *Journal of the American Society of Horticulture* 97:446-448. 1972.
18. LUGG, D. G. and SINCLAIR, T. R. Variation in stomatal density with leaf position in field-grown soybeans. *Crop Science* 19:407-409. 1979.
19. PALANIYANDI, R. and SMITH, C. B. Growth and nutrient interrelationships in snap beans as affected by several sources of potassium and magnesium. *Journal of the American Society of Horticultural Science*. 1978.
20. RADIN, J. W. and PARKER, L. L. Water relations of cotton plants under nitrogen deficiency. II. Environmental interactions on stomata. *Plant Physiology* 64:499-501. 1979.
21. SMITH, C. B. Growth responses, nutrient leaf concentrations, and interelement relationships of snap beans as affected by fertilizer treatments. *Journal of the American Society of Horticultural Science* 102:61-65. 1977.
22. STECKEL, J. E. and FLANNERY, R. L. Simultaneous determinations of phosphorus, potassium, calcium and magnesium in wet digestion solutions of plant tissue by auto-analyzer. *Instrumental methods for analysis of soils and plant tissue*. Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin 1971. pp. 83-96.
23. TESHA, A. J. and KUMAR, D. Effects of fertilizer nitrogen on drought resistance in *Coffea arabica* L. *Journal of Agricultural Science (Camb.)* 90:625-631. 1978.
24. TESHA, A. J. and KUMAR, D. Effects of soil moisture, soil K and N on mineral absorption and growth of *Coffea arabica* L. *Turrialba* 29:213-218. 1979.

ESTUDIO DE LA ANTRACNOSIS EN GUANABANA (*Annona muricata* L.). I. EFECTO EN LA MORFOLOGIA DE LAS HOJAS¹

J. F. SUBIROS*
E. M. FLORES*
E. VARGAS**

Summary

Leaves of Annona muricata L. (soursop) were inoculated with a suspension of Colletotrichum gloeosporioides Penz. conidia under greenhouse conditions. Samples were taken at different time intervals and prepared for light and electron microscopy observation. Most of the spore germination occurred between 24 and 36 hours after inoculation. Penetration through stomata was not observed. Appressoria started to develop infective hypha 24 hours later, without penetration of the cytoplasm. After 60 hours, the palisade and spongy parenchyma were damaged. Four or five days later, the cell walls in contact with appressoria and mycelia were destroyed. At the end of fifty days, the leaves were completely damaged. It is suggested that the fungus degrades the cuticle and the epidermal cell walls enzymatically.

Introducción

A*nnona muricata* L. (Annonaceae) en un cultivo pantropical. El fruto es rico en vitaminas y minerales y se utiliza en la elaboración de helados, jugos, concentrados aromáticos, gelatina, confites, sorbetes y siropes (6, 8, 10, 17, 19, 25). Las semillas pueden emplearse como suplemento en la alimentación de vacunos y también en la industria del jabón (6).

Con frecuencia *Colletotrichum gloeosporioides* (Deuteromycetidae), afecta la planta y produce la antracnosis; que ocasiona daños muy severos en tallos, hojas, flores y frutos (2, 4, 23, 24). En Costa Rica la enfermedad es severa en zonas de alta precipitación (23). Pequeñas manchas de color verde claro son los síntomas iniciales; éstas se agrandan con alta humedad relativa y forman grandes lesiones que se expanden hasta que toda la hoja es afectada y finalmente

defolia. El patógeno se disemina de la lámina foliar a los peciols y luego alcanza los tallos jóvenes, provocando la muerte descendente de las ramas (2, 3, 4, 16, 23, 25, 27).

El presente trabajo describe las alteraciones morfológicas que produce el hongo en las hojas de guanábana.

Materiales y métodos

En esta investigación se utilizaron plantas de guanábana (*Annona muricata*) de 25 a 30 cm de altura, que crecieron en condiciones de invernadero. Se inoculó las hojas jóvenes con un asa, en forma localizada y con el cuidado de no provocar heridas. Para ello, se empleó una suspensión de conidios de *C. gloeosporioides* aislados de lesiones foliares en plantas infectadas y cultivados en un medio nutritivo de papa dextrosa y agar en platos de Petri.

Los conidios de 15 días de edad fueron removidos con agua destilada y concentrados por centrifugación. En el lugar de aplicación de las esporas se colocó una cobertura de algodón y papel de filtro humedecido con agua destilada; se sostuvieron con piezas de papel plástico y se selló los bordes con cinta adhesiva para favorecer la germinación de las esporas. El ensayo se realizó durante los meses de agosto, setiembre y octubre de 1982.

¹ Recibido para publicación el 9 de marzo de 1984. Este trabajo es parte de la tesis presentada por el autor principal a la Escuela de Fitotecnia de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar el grado de Licenciado en Ingeniería Agronómica.

* Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica.

** Escuela de Fitotecnia, Universidad de Costa Rica.

Se colectaron muestras de hojas jóvenes inoculadas y secciones sanas cada ocho horas hasta completar 24 horas; cada 12 horas hasta completar 48 horas y cada 24 horas hasta completar cinco, siete, nueve y cincuenta días.

Los materiales para microscopía de luz fueron fijados en FAA (15) y/o glutaraldehído (16). Luego se lavaron con agua destilada, se deshidrataron por medio de una serie de alcohol butílico terciario (14) y se infiltraron en parafina. Se practicaron cortes transversales, longitudinales y paradermales de 10 μm de grosor. Se tiñó las secciones utilizando la técnica de Sharman (32).

Los materiales para microscopía de barrido fueron fijados en glutaraldehído al 4% en buffer de fosfatos a pH 7.0. Luego se lavaron con una solución buffer, se deshidrataron por medio de una serie ascendente de alcohol y acetato de amilo. Las muestras se secan en bases de aluminio, se cubrieron con oro y se examinaron al microscopio electrónico de barrido.

Resultados

Descripción morfológica de las hojas sanas

Las hojas son alternas, simples, enteras, exestipuladas y dorsiventrales. La epidermis abaxial y adaxial es uniseriada. Las células epidérmicas son rectangulares en la superficie abaxial y más cortas y redondeadas en la superficie adaxial. En ambos casos son uninucleadas y de bordes sinuosos (Figura 1). El grosor aproximado de la lámina foliar es de 0.15 mm aunque en la zona de la vena media alcanza hasta 0.33 mm. La cutícula tiene un grosor similar en ambas superficies. En estadios tempranos la superficie foliar es muy corrugada; esta característica desaparece cuando la hoja se desarrolla por completo.

En el haz y el envés hay idioblastos de tipo secretor, de forma redondeada, asociados a las células epidérmicas. La hoja es hipostomática. Los estomas son de tipo paracítico (rubiáceo) y alrededor de éstos se observan estrías bastante profundas (Figura 2).

La lámina foliar posee tricomas solitarios y bicelulares; a veces, éstos son multicelulares y de base compuesta. Son numerosos en la superficie abaxial, cerca de la vena media (Figura 2). El extremo distal de los tricomas, presenta acúmulo de sustancias fenólicas. En forma esporádica se observan esclereidas en el mesofilo.

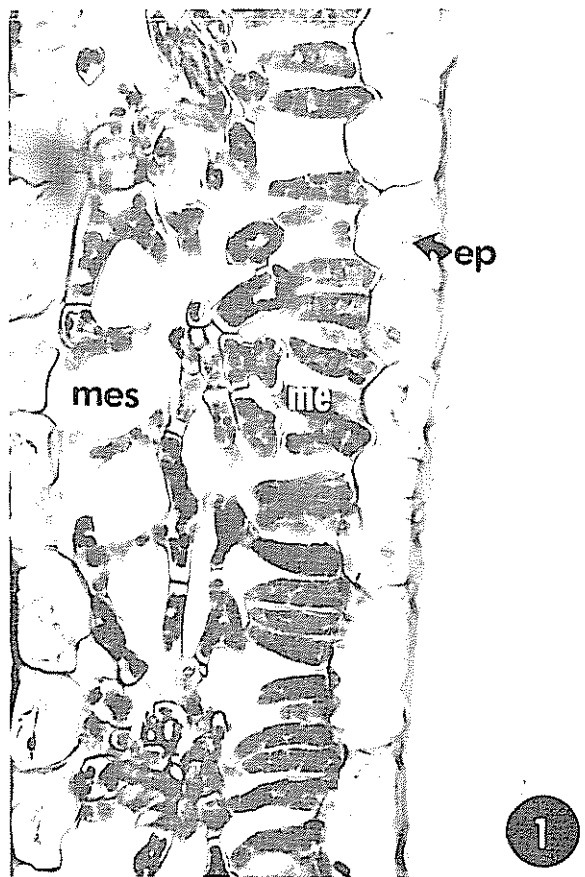


Fig 1 Sección transversal de una hoja sana (196X).
ep: epidermis, me: mesofilo de empalizada mes:
mesofilo esponjoso

Germinación de las esporas y efecto del hongo en las hojas

A las 16 horas de efectuada la inoculación, los conidios comienzan a germinar, pero no es sino hasta 24 ó 36 horas después que ocurre la mayor germinación. Los últimos forman de inmediato el apesorio, o recorren un trecho bastante largo sobre la superficie de la hoja antes de diferenciar dicha estructura. Este es periforme, estrecho en la base y ancho en el extremo distal (Figuras 3 y 5). La mayoría se forma entre las 16 y 48 horas. Algunas veces se producen divisiones bifidas del tubo germinativo; en cada una de ellas se origina un apesorio terminal. La formación de tubos germinativos por varios puntos de un mismo conidio se observó en algunos casos (Figura 3). En ningún estadio se vio penetrar el hongo por vía estomática, aún cuando el tubo germinativo pasara sobre el ostiolo.

Los apesorios se desarrollan intercelularmente e intracelularmente.

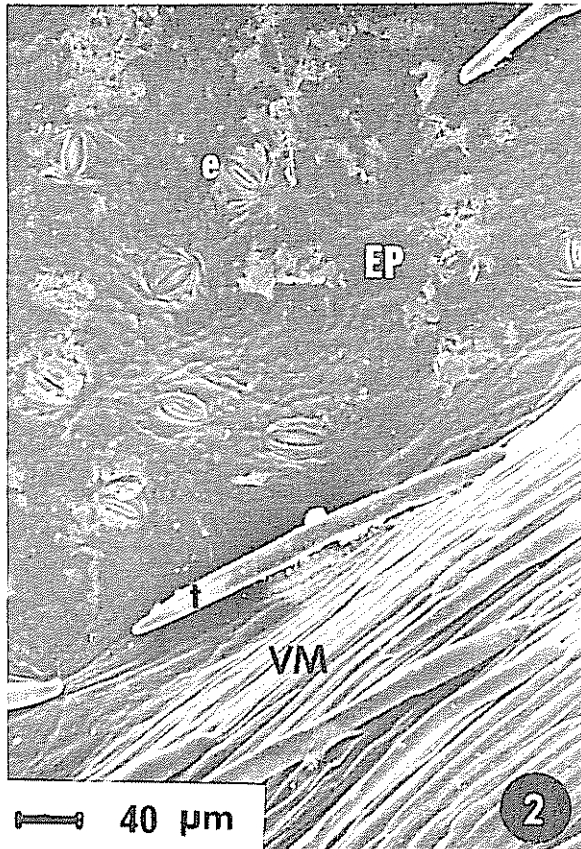


Fig. 2. Superficie abaxial de la hoja sana, observada al microscopio electrónico de barrido. t: tricoma, vm: vena media, ep: epidermis, e: estoma.

A las 24 horas de efectuada la inoculación, algunos apresorios desarrollan hifas infectivas que penetran la pared epidérmica. A las 36 horas, se forman pequeños puntos circulares de una coloración pardo oscura, apenas perceptibles a simple vista, distribuidos en diferentes puntos de la zona inoculada. Doce horas más tarde, algunos haces vasculares se oscurecen, pero no hay evidencia de que sea a causa de la actividad del hongo.

La mayoría de los apresorios no desarrollan hifas infectivas que penetren las células, y son, en apariencia, estructuras latentes. En las células donde se localizan apresorios con hifas infectivas se produce un aumento de la densidad del citoplasma; además, algunos agregados se ubican debajo de la estructura sin producir distorsión celular.

A las 48 horas de inoculada la hoja, existe una gran cantidad de micelio en la superficie foliar y hay alteración cuticular. En apariencia, el hongo efectúa una acción enzimática tendiente a disolverla.

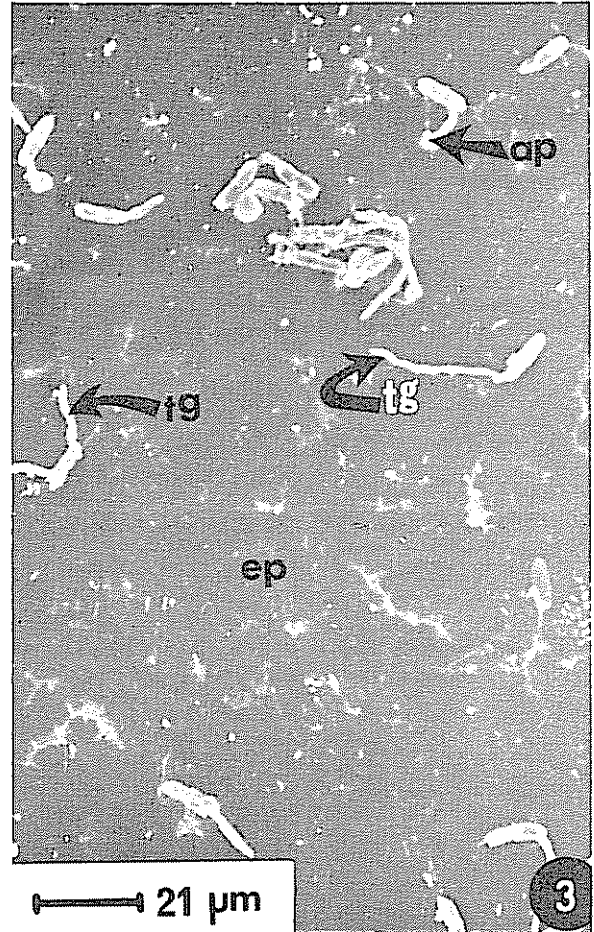


Fig. 3. Germinación de los conidios 24 horas después de realizada la inoculación. Nótese la formación de varios tubos germinativos a partir de un conidio y la formación temprana de apresorios. ap: apresorio, ep: epidermis, tg: tubo germinativo.

Sesenta horas después de la inoculación, además de observarse los síntomas de los estadios anteriores, se identificaron pequeñas áreas oscuras en la epidermis, inconspicuas lesiones esporádicas y reproducción superficial de conidios. En estas últimas lesiones la epidermis se necrosa, las paredes anticlinales se distorsionan, forman pliegues y el contenido celular se torna más denso, adquiriendo una tonalidad oscura. El tamaño del núcleo aumenta en algunos casos. El mesofilo de empalizada también se necrosa y las células pueden sufrir hipertrófia. Parte del mesofilo esponjoso es también afectado (Figura 4). Internamente no se distingue micelio.

Conforme avanza la acción del hongo sobre la cutícula, ésta muestra indicios de disolución. También

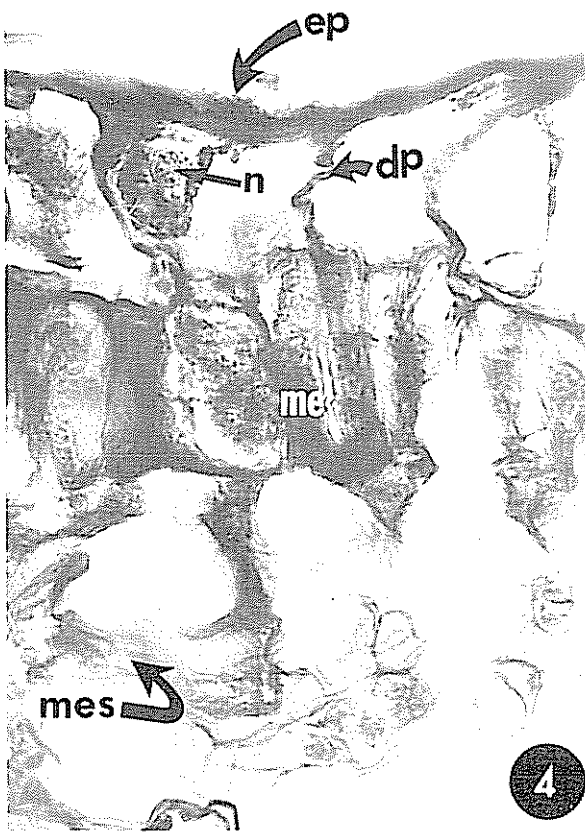


Fig 4 Corte transversal de la hoja. Obsérvese el daño causado por el hongo, 60 horas después de haber sido inoculadas (672X).
ep: epidermis, dp: doblamientos de pared, n: núcleo, me: mesofilo de empalizada, mes: mesofilo esponjoso.

se forman lesiones alargadas que llegan a alcanzar una longitud que oscila entre 0.8 y 1.5 mm y lesiones circulares de un diámetro de 0.35 mm que adquieren en el centro una coloración negruzca y un halo pardo rojizo.

Del tercero al noveno día, las lesiones adquieren un tamaño ligeramente mayor y se hacen más conspicuas. La epidermis se comprime mucho y la lámina foliar sufre una reducción en el grosor. Las células del mesofilo esponjoso y de empalizada se contraen bastante. Cuando el haz vascular coincide con el área de la lesión, se distorsiona y esclerotiza; el floema se oscurece y es frecuente la formación de tilides en el xilema. La actividad enzimática de los apresorios y del mismo micelio se hace muy notoria ya que provoca la ruptura de las paredes celulares epidérmicas en los puntos de contacto (Figuras 5, 6 y 7).

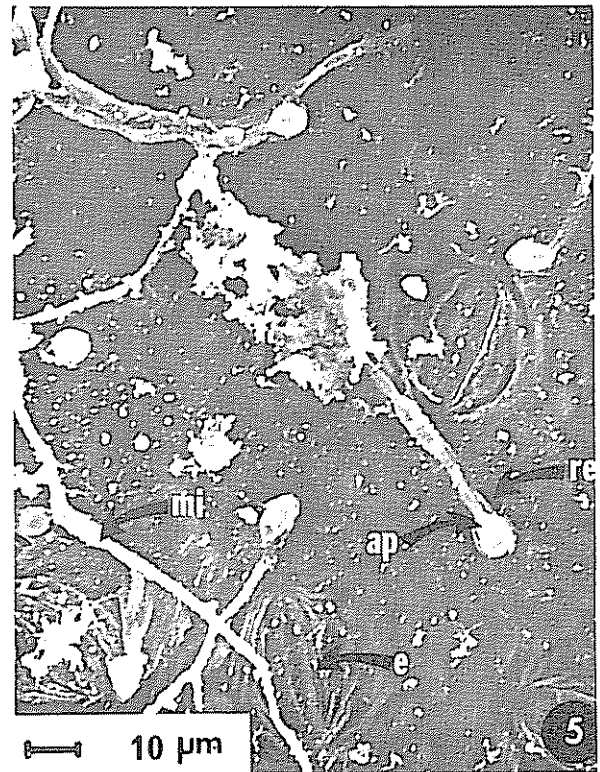


Fig 5 Apresorios en la cara abaxial, cuatro días después de realizada la inoculación. re: rompimientos de epidermis, e: estoma, mi: micelio, ap: apresorio

A los 50 días, las células epidérmicas sufren un colapso total y las paredes periclinales establecen contacto con las contiguas; algunas porciones se rompen. El mesofilo de empalizada también se necrosa y colapsa; en apariencia, los cloroplastos se desintegran. El mesofilo esponjoso casi desaparece (Figura 8). Los haces vasculares son muy afectados, el floema se oscurece y oblitera. Los elementos de los vasos, a menudo, se obstruyen por la formación de tilides. La presencia de micelio es común en el interior de la lámina. En la superficie externa se desarrollaron acérvulos adaxial y abaxialmente en forma esporádica. Estos poseen un estroma con conidióforos libres, no ramificados, que originan una gran cantidad de conidios.

Discusión

La superficie epidérmica irregular y la cutícula delgada de las hojas jóvenes podría tener algún efecto en la acumulación de conidios y agua en las depresiones y formarse un microclima especial. El tiempo que tardaron los conidios en germinar en las hojas de guanábana, coincide bastante con el observado en otros cultivos (9, 20, 26, 30). Después de la germinación, algu-

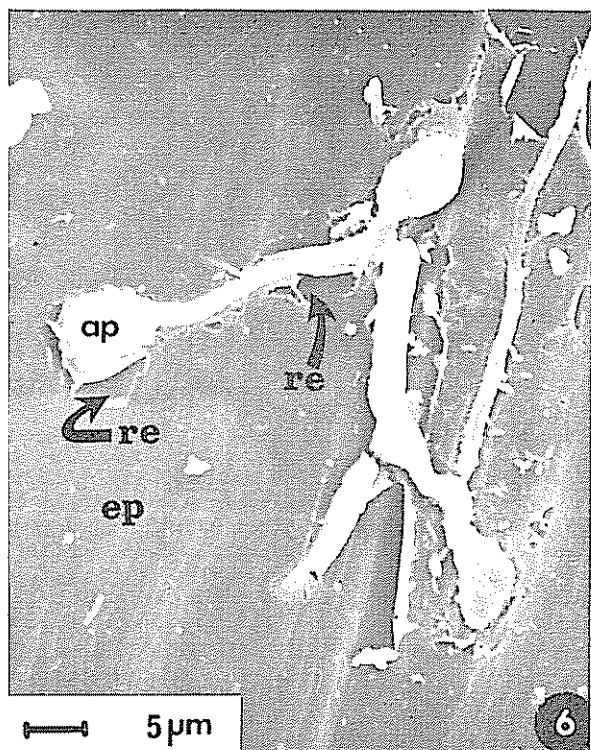


Fig. 6. Apresorio y micelio, ejerciendo una acción enzimática sobre la epidermis cinco días después de realizada la inoculación
ep: epidermis, ap: apresorio, re: rompimiento de epidermis.

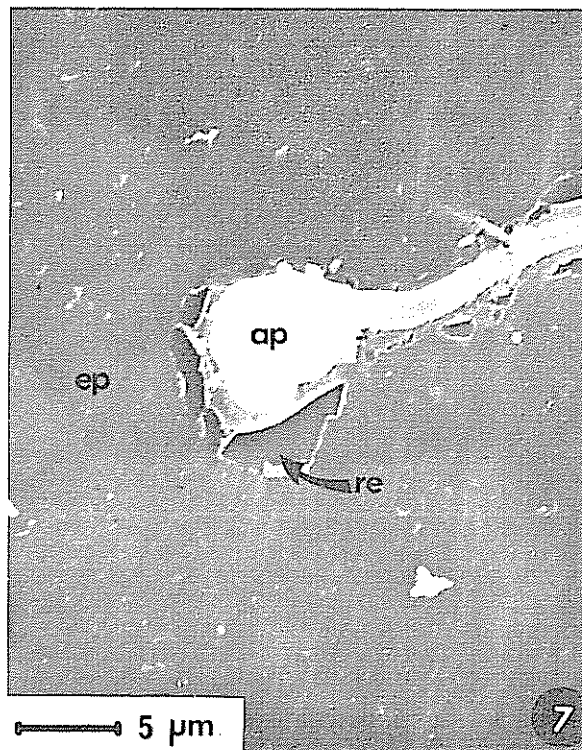


Fig. 7. Ampliación de una sección de la figura anterior.
ep: epidermis, re: rompimientos epidérmicos, ap: apresorio.

nos tubos germinativos desarrollaron inmediatamente el apresorio. Por el contrario, en otros, se extendió bastante lejos del punto de origen. Se supone que esto se debió a factores de competencia, ya que la inoculación se realizó con una alta concentración de esporas. También pudieron influir factores ambientales.

Durante los diferentes períodos de inoculación, no hubo evidencia de que las hifas infectivas de los apresorios penetraran al citoplasma. Esto sugiere que los apresorios son estructuras latentes del hongo y que solo bajo ciertas condiciones apropiadas podrían inducir la penetración de la hifa infectiva: por ejemplo, ciertas concentraciones de etileno (9, 12, 29, 34), determinado grado de humedad u otros factores. También indica este fenómeno, que el principal mecanismo de penetración no es por este medio, si no por otro, que será discutido más adelante.

El hongo inicia la actividad en la epidermis, y éste es el primer tejido afectado. Al cuarto día de inoculación, los resultados mostraron, que en apariencia, el hongo ejerce una acción enzimática sobre ese tejido:

esta acción va dirigida, en principio, hacia la disolución de cutícula. En los estados avanzados de inoculación, esta acción fue muy conspicua. El micelio y los mismos apresorios ejercen un efecto directo sobre la epidermis; provocan la disolución de la cutícula y la lisis de la pared como pudo observarse en las figuras respectivas. Esto hace pensar que el efecto principal de *C. gloeosporioides* es de carácter enzimático. Al respecto, existe una considerable evidencia de que las células del hospedante y/o la cutícula puede ser degradadas por enzimas durante el inicio de la penetración (7, 12, 22, 28, 31). Esta acción química provoca la desintegración de la pared y facilita el ingreso del micelio al interior del órgano.

En muchos casos, las células donde se localizan los apresorios, aumentan los agregados citoplasmáticos. Generalmente se considera este proceso como el reconocimiento mutuo inicial entre las células y el patógeno (5). Esto puede ser una respuesta de la célula a la penetración del hongo o secreción por parte del apresorio de algunas sustancias. En casos aislados, pareció que la plasmólisis de las células epidérmicas guardaba

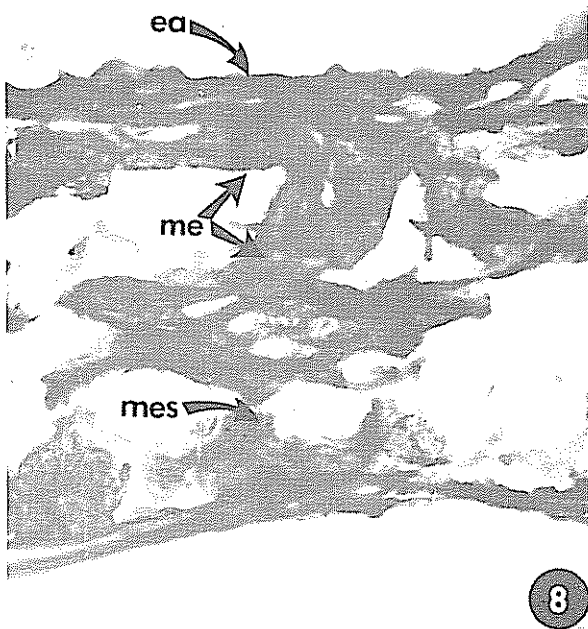


Fig. 8. Sección transversal de hoja completamente dañada, 50 días después de haber sido inoculada (672X)
ea: epidermis, adaxial, me: mesófilo de empalizada, mes: mesófilo esponjoso.

relación con la posible absorción de contenidos citoplasmáticos por parte de las hifas infectivas. Una vez realizada la lisis cuticular y la desintegración de la pared epidérmica, el micelio puede penetrar a los tejidos internos de la hoja, ya que muchos apresorios se forman en la pared entre las células contiguas o sobre ellas. La formación intercelular de esas estructuras sugiere una respuesta táctil del tubo germinativo, el cual, al hacer contacto con los bordes sinuosos de las células epidérmicas, induciría la diferenciación de los apresorios en esos puntos. Este proceso ha sido observado en otros hongos (35).

En las observaciones hechas, se pudo notar que la cantidad y velocidad de desarrollo de las lesiones, fue mayor en la cara adaxial. Este hongo muestra preferencia por el xilema y la penetración por superficie adaxial le permite alcanzar rápido este tejido. La superficie adaxial tiene una cutícula similar a la abaxial. Por lo tanto, en este caso concreto, el grosor cuticular no parece ser una barrera al ingreso del patógeno.

La cutícula de las plantas se considera la primera línea de defensa que se opone al ingreso de patógenos

y se asume que el grosor o composición química puede inhibir infecciones fúngicas mediante reducción en la germinación de esporas o penetración hifal (1). Martín y Juniper (21) establecen que los ácidos grasos no saturados que forman parte de las ceras cuticulares foliares constituyen la primera barrera estructural que dificulta el acceso del hongo a las células. Sin embargo, son cada día más los casos en los que no se observa relación entre el grosor o composición cuticular con el ingreso de hongos a los tejidos. Jarosz *et al* (13) puntualizan que el grosor de la cutícula puede variar bajo condiciones de menor intensidad de luz y temperatura o de mayor humedad.

El efecto más notorio es la afección del tejido vascular, en especial, del xilema; éste se necrosa y obstruye por la formación de tálides. El micelio puede desplazarse, sin dificultad por traza foliar y llegar hasta el cilindro central. También puede penetrar por las cicatrices foliares. La infección foliar también reduce la fotosíntesis ya que los mesófilos son bastante afectados. Esta reducción estaría relacionada con la magnitud de los daños producidos, ya que si éstos son grandes, hay caída de las hojas.

En pruebas preliminares al presente trabajo, se provocaron pequeñas lesiones sobre la superficie epidérmica de las hojas. Se comprobó que el hongo se desarrolla más fácil y rápido que en las pruebas de inoculación realizadas. Es importante entonces considerar que el patógeno además de penetrar en forma directa, puede hacerlo mediante heridas causadas por diferentes insectos tales como áfidos y membracidos (11, 33) y otros agentes como el viento y el roce mecánico de las hojas.

Resumen

Se inocularon hojas de *Annona muricata* L. (guanábana) con una suspensión de conidios de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. bajo condiciones de invernadero. Se colectaron muestras a diferentes intervalos de tiempo y se prepararon para ser observadas al microscopio de luz y microscopio electrónico de barrido.

La germinación de las esporas ocurrió en su mayoría entre las 24 y 36 horas posteriores a la inoculación. No se notó penetración por vía estomática. A las 24 horas, los apresorios comenzaron a desarrollar hifas infectivas sin que llegaran a penetrar al citoplasma. Transcurridas 60 horas el mesófilo de empalizada y el esponjoso sufren bastante daño. Entre el cuarto y quinto día se nota claramente un deterioro de la pared en los puntos de contacto entre la epidermis y los apresorios y el micelio. A los 50 días, la hoja queda dañada, por completo, en el punto de la lesión.

Se sugiere que el hongo degrada enzimáticamente la cutícula y luego la pared epidérmica

Literatura citada

1. AGRIOS, G. N. Plant pathology. Academic Press, New York. 1978. 629 p.
2. ALVAREZ, L. A. Anthracnose of the Annonaceae in Puerto Rico. Journal of the Agriculture of the University of Puerto Rico 33(1): 27-43. 1949.
3. ANONIMO. Primer curso internacional sobre fruticultura tropical. El cultivo de la guanábana. Maracay Venezuela 1978 pp 1-28
4. ARRUDA, S. C. Anthracnose e cancro das anoneas. O'Biologico 4(8):224-225. 1940.
5. ASADA, Y., BUSLMELL, W. R., OUCHI, S., y VANCE, C. P. eds. Plant infection: The physiological and biochemical basis. Japan Scientific Society Press. Tokio. 1982. 362 p.
6. AWAN, J. A., KAR, H., y UDOUDOH, P. J. Preliminary studies on the seeds of *Annona muricata* Linn. Qualitas Plantarum Plant Foods Human Nutrition 30(2):163-168. 1980
7. BAKER, J. Cutin degradation by plant pathogenic fungi. Phytopathology 68:1577-1584. 1978
8. BENERO, J. R., RODRIGUEZ, A. J., ROMAN DE SANDOVAL, A. A soursop pulp extractions procedure. Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico 55(4):518-519. 1971.
9. BINYAMINI, N. y SCHIFFMANN-NEDEL, M. Latent infection in avocado fruit due to *Colletotrichum gloeosporioides*. Phytopathology 62:592-594. 1972
10. CORDOBA, J. A. La chirimoya. Agricultura Tropical 17(11):647-664. 1961
11. DOMINGUEZ, D. E. Insectos perjudiciales del guanábano (*Annona muricata* L.) en el Estado de Zulia, Venezuela. Revista de la Facultad de Agronomía 4(3):149-163. 1978
12. HEITFUSS, R. y WILLIAMS, P. H. eds. Physiological plant pathology. Springer Verlag. Berlin 1976. 890 p.
13. JAROSZ, A. M., SHEETS, M. y LEVY, M. Cuticle thickness in *Phlox* and resistance to powdery mildew: an unreliable line of defense. American Journal of Botany 6(9): 824-828. 1982
14. JENSEN, A. W. Botanical histochemistry. W. H. Freeman & Co. Berkeley, California. 1962. 326 p.
15. JOHANSEN, D. A. Plant microtechnique. McGraw Hill Book Co. New York. 1940. 523 p.
16. KORNOUSKY, M. J. A formaldehyde gluteraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. Journal of Cell Biology 27:137-138. 1965.
17. LAKSHMINARAYANA, S., VELAZCO, J., SARMIENTO, L. y ANDRADE, R. Investigación preliminar sobre fisiología post-cosecha e industrialización de la guanábana (*Annona muricata* L.). Serie Investigaciones Fisiológicas 4. Comisión Nacional de Fruticultura Sag/México, 1974. pp. 5-12
18. LEAL, F. Notas sobre la guanábana (*Annona muricata*) en Venezuela. Proceedings of the tropical region. American Society for Horticultural Science 14:118-121. 1970.
19. LEON, J. Fundamentos botánicos de los cultivos tropicales. San José. IICA. 1968. 487 p.
20. MARKS, G., BERBEE, J. G. y RIKER, A. J. Direct penetration of leaves of *Populus tremuloides* by *Colletotrichum gloeosporioides*. Phytopathology 55:408-412. 1965
21. MARTIN, J. T. y JUNIPER, B. E. The cuticles of plants. E. Arnold Press Ltd. 1970. 345 p.
22. McKEEN, W. E. y REIMER, S. R. Initial penetration process in powdery mildew infection of susceptible barley leaves. Phytopathology 63:1049-1055. 1973.
23. MORALES, F. Observaciones sobre la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) de la guanábana (*Annona muricata*) en Costa Rica. Primer congreso latinoamericano de fitopatología. Resúmenes. Maracaibo, Venezuela. 1979
24. MORALES, F. Ensayo sobre fungicidas para el combate de antracnosis en guanábana

- (*Annona muricata* L.). *Agronomia Costarricense* 5(1/2):75-80. 1981.
25. MORTON, J. F. The soursop guanabana (*Annona muricata* L.) Proceedings of the Florida State Horticultural Society 79:355-366. 1967.
26. NAIR, J. y CORBIN, J. B. Histopathology of *Pinus radiata* seedlings infected by *Colletotrichum acunatum*. *Phytopathology* 71:777-783. 1981.
27. NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. Underexploited tropical plants with promising economic value. Washington. 1975. 188 p.
28. NICHOLSON, R. L., KUC, J. y WILLIAMS, E. B. Histochemical demonstration of transitory sterase activity in *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 62:1242-1247. 1972.
29. PARBERY, D. G. y EMMET, R. W. Hypothesis regarding appresoria, spores, survival and phylogeny in parasitic fungi. *Review de Mycologie* 41:429-447. 1977.
30. QUIMIO, T. H. y QUIMIO, A. J. Pathogenicity of mango anthracnose organism. *Philippine Agriculturist* 58(7/8):322-329. 1975.
31. SCHMITTHERNER, A. F. Hydrolysis of pectin and cellulose by isolates of *Colletotrichum phomoides*, *C. lagenarium* and *Glomerella cingulata*. *Phytopathology* 42(9):474. 1952.
32. SHARMAN, B. C. Tanic acid and iron alum with safranin and orange G in studies of the shoot apex. *Stain Technology* 18:105-111. 1943.
33. STARY, P. Parasites and their role in limitation and control of aphidis attacking annonaceous trees in the West Indies /Hymenoptera: Aphidiidae; Homoptera: Aphidoidea). *Turrialba* 18(2):129-132. 1968.
34. WILLIAMS, P. H. How fungi induce disease. In *Plant Disease: An advance treatise*. J. G. Harsfal y E. B. Coraling eds. Vol. IV. Academic Press. London. 1978. pp. 163-179.
35. WYN, W. K. Appressorium formation over stomates by the bean rust fungus: Response to surface contact stimulus. *Phytopathology* 66(2):136-146. 1976.

ACÇÃO DE REGULADORES DE CRESCIMENTO NOS TEORES DE PROTEÍNA E AMINOÁCIDOS EM SOJA (*Glycine max* cv. Davis)¹

P. R. C. CASTRO*
O. J. CROCOMO**

Summary

*This research dealt with the effects of (2-chloroethyl) trimethylammonium chloride (CCC) at a concentration of 2 000 ppm, succinic acid-2, 2-dimethylhydrazide (SADH) 4 000 ppm, gibberellic acid (GA) 100 ppm, and indolylacetic acid (IAA) 100 ppm applied to soybean (*Glycine max*) plants, under greenhouse conditions, on the protein and aminoacid level of the seeds. Growth regulators were sprayed on leaves 21 days old and the seeds were harvested 118 days after planting. Protein levels were estimated determining total nitrogen by the micro-Kjeldahl method multiplied by 6.25. Aminoacids were determined in the automatic aminoacid analyser Beckman 120C. A completely randomized design was used and the differences were analyzed by Tukey's test at 5% level of probability. Spraying with CCC increased protein levels in seeds. The growth regulators did not promote changes in aminoacid levels in "Davis" soybean seeds.*

Introdução

Alterações nos níveis de proteína e aminoácidos nas sementes de plantas tratadas com reguladores de crescimento poderão vir a mostrarem-se desejadas em cultivos alimentares. Howell (8) observou que o nitrogênio total na planta de soja aproximadamente triplica durante o desenvolvimento das sementes. A porcentagem de proteína varia de acordo com a cultivar e as diferenças ambientais. Consideram-se sementes com baixo teor de proteína as que possuem 32 a 33%, sendo que aquelas com alto teor mostram 47 a 48% de proteína. O fator comumente aceito para a conversão de nitrogênio em proteína na semente de soja é de 6,25. Foram encontrados na proteína de soja 18 aminoácidos, contendo cerca de 95% de nitrogênio protéico. Traços de outros aminoácidos encontram-se provavelmente presentes. O ácido glutâmico é o aminoácido mais abundante, possuindo cerca de 19% do nitrogênio protéico. Ácido aspártico e leucina respondem cada um por cerca de

8% e arginina por 7%. Metionina é o aminoácido mais suscetível de apresentar-se deficiente quando a soja é utilizada na alimentação. Albert *et al.* (1) realizando determinações bioquímicas em sementes de 18 cultivares de soja desenvolvendo-se sob diferentes condições de solo e clima, notaram que o conteúdo de proteínas, lipídeos, aminoácidos e a composição dos ácidos graxos dos lipídeos, dependem mais das características biológicas da cultivar do que das condições ambientais. Com o aumento do teor de proteína nas sementes os teores de lisina e metionina tendem a decrescer. Com o aumento do conteúdo de óleo nas sementes, o conteúdo de ácido oleico aumenta e dos ácidos linoleico e linolênico decrescem.

Athayde (2) constatou aumento na quantidade de nitrato nos pecíolos de plantas de algodoeiro tratadas com doses crescentes de cloreto (2-cloroetil) trimetilamônio (CCC); sendo que a porcentagem de nitrogênio total na semente não mostrou variações significativas. Humphries (10) observou que o N total e o N protéico estavam em maiores quantidades nas folhas primárias em desenvolvimento. Quando as plantas de feijoeiro eram tratadas com CCC, atrasavam o tempo de decréscimo dos teores de N nas folhas. Em plantas tratadas com CCC o N deve mover-se mais lentamente das folhas primárias, sendo que as folhas de plantas decapitadas têm mais N porque não possuem ápice como região de utilização. Variações na proteína foliar foram correlacionadas com alterações na

¹ Recebido para publicação 15 de dezembro de 1981.

* Professor de Fisiologia Vegetal da E.S.A. "Luiz de Queiroz" - USP., Cx. Postal 9, 13 400 - Piracicaba (SP), Brasil.

** Professor de Bioquímica de Plantas da E.S.A. "Luiz de Queiroz" e CENA-USP., 13 400 - Piracicaba (SP), Brasil.

clorofila durante o desenvolvimento da planta. Berry e Smith (3) notaram que altas concentrações de CCC inibem a síntese de clorofila e proteína em segmentos foliares de cevada. Bouniols *et al.* (4) realizaram pulverização foliar com 200 a 500 l de ácido succínico-2,2-dimetilhidrazida (SADH)/ha e 1,25 a 5 l de CCC/ha em soja 'Amsoy' no estádio de 4 folhas e 5 dias mais tarde. Verificaram que CCC melhorou a qualidade da proteína das sementes, principalmente nas parcelas sem irrigação. Castro e Gutierrez (5) notaram aumento de 2,4 para 3,0% nos teores de aminoácidos livres em folhas de algodoeiro cujas sementes foram imersas por 22 horas em solução de CCC 2 000 ppm. Ácido indolilacético (IAA) 100 ppm decresceu os níveis de aminoácidos livres de 2,4 para 1,9% peso da matéria seca.

Gowda (7) verificou que o teor de proteína nas sementes de soja mostrou-se mais elevado nas plantas tratadas com SADH 3 000 ppm. Souza *et al.* (11) efetuaram quatro aplicações foliares, em intervalos de uma semana, com soluções 0, 25, 50 e 75 ppm de ácido giberélico (GA) em plantas de soja. Na colheita observaram que a aplicação do regulador de crescimento 50 dias após o plantio pode afetar a produção de sementes. O teor de óleo mostrou-se mais elevado com a aplicação de GA 40 dias após o plantio. O nível de proteína não foi alterado com a aplicação de GA. Howell *et al.* (9) verificaram redução no número de plantas germinadas por área e na produção de soja, utilizando-se aplicação de 2 ou 8 g de giberelato de potássio por 0,035 m³ de sementes. Enquanto as plantas tratadas mostraram-se mais altas no estádio inicial, na maturidade as plantas controle revelaram-se acima de 12,5 cm mais altas do que as plantas tratadas. A época de maturação e o teor de óleo e de proteína não foram alterados significativamente pelo tratamento com o regulador de crescimento.

Procurou-se no presente trabalho determinar as possíveis alterações nos teores de proteína e aminoácidos nas sementes de plantas de soja tratadas com alguns reguladores de crescimento.

Materiais e métodos

Iniciou-se o experimento em 20 de novembro de 1977, efetuando-se a semeadura da soja 'Davis' diretamente em vasos de cerâmica contendo 12 litros de terra. Realizaram-se os tratamentos culturais normais para a soja. Aplicaram-se os reguladores de crescimento em 14/12/77, através de pulverização foliar; sendo que nesta ocasião as plantas apresentavam 4 folhas definitivas. Além do controle aplicou-se cloreto (2-cloroetil) trimetilamônio (CCC) 2 000 ppm, ácido succínico-2,2-dimetilhidrazida (SADH) 4 000 ppm, ácido giberélico (GA) 100 ppm e ácido indolilacético (IAA) 100 ppm.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 6 repetições, tendo-se mantido uma planta por vaso e por repetição. Procedeu-se a comparação de médias pelo teste de Tukey, calculando-se a diferença mínima significativa ao nível de 5% de probabilidade. Para determinação dos teores de proteína e aminoácidos, utilizaram-se as sementes colhidas em 17/03/78. O teor de proteína foi estabelecido através da determinação da porcentagem de nitrogênio total e sua multiplicação pelo fator de 6,25, de acordo com Howell (8). A digestão para determinação do nitrogênio foi realizada com ácido sulfúrico, sendo que o extrato foi destilado pelo método micro-Kjeldahl. Os resultados obtidos referem-se à média dos valores de duas amostras. Os aminoácidos foram determinados no Analisador Automático de Aminoácidos Beckman modelo 120C, após hidrólise ácida da farinha em HCl 6N por 22 horas, segundo Spackman *et al.* (12).

Resultados e discussão

Não se observaram diferenças significativas nos teores de lisina, histidina, arginina, ácido aspártico, treonina, serina, ácido glutâmico, prolina, glicina, alanina, castina, valina, isoleucina, leucina, tirosina e fenilalanina nas sementes da planta de soja sob ação de reguladores de crescimento (Quadro 2).

Verificou-se pela análise química de proteína nas sementes de soja, determinada em 17/03/78, que a aplicação de reguladores de crescimento efetuada em 14/12/77 causou variações significativas neste composto. Observando-se as diferenças entre as médias verificou-se teores mais elevados de proteína nas sementes das plantas de soja tratadas com CCC (Quadro 1). Humphries (10) verificou que a aplicação de CCC aumenta o teor de nitrogênio nas folhas pelo fato deste nutriente mostrar-se menos exigido nas regiões de crescimento da planta. Athayde (2) também notou que o CCC aumentou o teor de nitrato nos pecíolos de algodoeiro, mas este aumento não se revelou suficiente para promover variação no nível de nitrogênio nas sementes de algodão. Tal resultado pode estar relacionado com o fato de altas concentrações de CCC poderem atuar diretamente na inibição da síntese de proteína em vez de afetar a produção da GA endógena, segundo Berry e Smith (3). Bouniols *et al.* (4) observaram que o CCC melhorou a qualidade da proteína das sementes de soja. O teor de proteína nas sementes de soja mostrou-se mais elevado nas plantas tratadas com SADH, segundo Gowda (7). O teor de proteína não foi alterado significativamente pela aplicação de GA em soja de acordo com Howell *et al.* (9) e Souza *et al.* (11). Howell (8) considerou que sementes de soja com baixo teor de proteína possuem 32 a 33%, sendo que aquelas com alto teor mostram 47 a 48% de proteína. Deste modo pode-se considerar

que a soja 'Davis' possui um nível médio de proteína, pois a média do controle mostrou-se acima do limite de 33% , além de ser considerada uma cultivar com 40% de proteína na semente segundo Gomes (6).

Observando-se as diferenças entre as médias, notou-se que as plantas tratadas com CCC apresentaram teor significativamente mais elevado de proteína nas sementes em relação àquelas tratadas com SADH, ao controle e IAA (Quadro 1).

Quadro 1. Médias dos teores de proteínas em porcentagem nas sementes da planta de soja sob efeito de reguladores de crescimento. Valores correspondentes aos testes F e Tukey (5%) e ao coeficiente de variação. Médias de 6 repetições. Piracicaba, 1977/78.

Tratamento	Proteína (%)
Controle	33.16
CCC	36.85
SADH	33.03
GA	34.21
IAA	33.26
F (trat.)	4.33**
D.M.S. (5%)	3.21
C.V. (%)	5.54

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Quadro 2. Médias dos teores de aminoácidos (AA) em g/100 g de proteína nas sementes da planta de soja sob efeito de reguladores de crescimento. Valores correspondentes aos testes F e Tukey (5%) e ao coeficiente de variação (%). Médias de 6 repetições. Piracicaba, 1977/78.

Aminoácido	Tratamentos						F	C.V.
	Controle	CCC	SADH	GA	IAA			
Lis	5.67	5.65	5.71	6.05	5.62	1.11 ^{ns}	7.18	
His	2.31	2.33	2.02	2.43	2.28	1.41 ^{ns}	13.84	
Arg.	6.90	6.94	7.13	7.36	6.83	0.87 ^{ns}	8.03	
Asp.	13.35	12.77	13.19	13.55	13.58	0.51 ^{ns}	8.52	
Thr	3.86	3.52	3.98	3.88	3.69	1.91 ^{ns}	8.39	
Ser	4.73	4.67	4.70	4.52	4.34	0.47 ^{ns}	12.60	
Glu	22.41	21.98	22.43	23.28	21.92	0.53 ^{ns}	8.20	
Pro.	4.64	4.46	4.53	4.88	4.58	1.61 ^{ns}	6.63	
Gli.	5.39	5.31	5.28	5.55	5.27	0.51 ^{ns}	7.50	
Ala	5.10	5.03	4.94	5.26	4.95	0.53 ^{ns}	8.60	
Cis	0.71	0.69	0.73	0.79	0.72	0.49 ^{ns}	17.79	
Val.	5.55	5.72	5.58	5.65	5.56	0.18 ^{ns}	7.52	
Ile.	5.60	5.36	5.37	5.52	5.38	0.28 ^{ns}	9.20	
Leu	8.67	8.34	8.26	8.81	8.08	2.16 ^{ns}	5.95	
Tir	3.68	3.58	3.51	3.57	3.74	0.54 ^{ns}	8.63	
Phe.	5.38	5.42	5.35	5.18	5.40	0.20 ^{ns}	9.88	

ns Não significativo pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Aplicação de reguladores de crescimento não alterou os teores de lisina, histidina, arginina, ácido aspártico, treonina, serina, ácido glutâmico, prolina, glicina, alanina, cistina, valina, isoleucina, leucina, tirosina e fenilalanina, nas sementes de soja de acordo com as análises realizadas (Quadro 2) Athayde (2) também observou que o CCC não alterou os níveis de aminoácidos nas sementes de algodoeiro. Howell (8) verificou que o ácido glutâmico revelou-se o aminoácido mais abundante em soja, o que está de acordo com o resultado obtido no presente trabalho. A metionina mostrou-se ao nível de traços no presente ensaio, sendo que Howell (8) considerou este aminoácido o mais suscetível de apresentar-se deficiente em uma dieta alimentar com soja. Albert *et al.* (1) observaram que com o aumento no teor de proteína nas sementes, os teores de lisina e metionina tendem a decrescer. No presente ensaio verificou-se aumento no nível de proteína nas sementes das plantas tratadas com CCC mas o teor de lisina não apresentou decréscimo significativo em relação ao controle no tratamento com CCC. A metionina, ocorrendo ao nível de traços, não permitiu a verificação de alterações em seus níveis com os diferentes tratamentos. Castro e Gutierrez (5) observaram que aplicação de CCC aumentou o conteúdo de aminoácidos livres totais nas folhas de algodoeiro.

Conclusões

O desenvolvimento do presente trabalho permitiu chegar-se às seguintes conclusões:

1 Tratamento com cloreto (2-cloroetil) trimetilamônio aumenta o teor de proteína nas sementes de soja.

2 A soja 'Davis' mostra 33.2% de proteína nas sementes.

3 Os teores de aminoácidos nas sementes não são afetados pelos reguladores de crescimento.

4. O ácido glutâmico é o aminoácido mais abundante nas sementes de soja.

Resumo

Este trabalho estuda o efeito da aplicação de cloreto (2-cloroetil) trimetilamônio (CCC) 2 000 ppm, ácido succínico-2,2-dimetilhidrazida (SADH) 4 000 ppm, ácido giberélico (GA) 100 ppm e ácido indolilacético (IAA) 100 ppm no teor de proteína e nos níveis de aminoácidos da semente de soja 'Davis'. Os reguladores de crescimento foram aplicados 24 dias após a semeadura, através de pulverização foliar. A colheita das sementes foi realizada 118 dias após a semeadura, sendo que o teor de proteína foi estabelecido através da determinação da porcentagem de nitrogênio total pelo método micro-Kjeldahl e multiplicação pelo fator 6.25; os aminoácidos foram determinados no analisador automático Beckman mod. 120C. Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado e procedeu-se a comparação de médias pelo teste Tukey (5%). Plantas tratadas com CCC mostraram teor mais elevado de proteína nas sementes em relação ao controle. Os teores de aminoácidos nas sementes não foram afetados pelos reguladores de crescimento.

Literatura citada

- 1 AL'BERT, V. E., KRASIL'NIKOV, V. N., KYUZ, E. P., GORSHKOVA, E. I. e STOI-KOVA, V. Ya. Chemical composition of seeds of some soybean cultivars and changes in it under the influence of weather, soil and climatic conditions. *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya* 12:186-191. 1976.
- 2 ATHAYDE, M. L. F. Efeitos de N e de cloreto de clorocolina (CCC) no metabolismo nitrogenado e em algumas características do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.). Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil 1980. 94 p.
- 3 BERRY, D. R. e SMITH, H. The inhibition by high concentrations of (2-chloroethyl) trimethylammonium chloride (CCC) of chlorophyll and protein synthesis in excised barley leaf sections. *Planta* 91:80-86. 1970.
4. BOUNIOLS, A., DECAU, J., PACE, A., MONDIES, M. e PUJOL, B. Influence de régulateurs de croissance (B9 et CCC) sur le développement et la fructification de cultures de soja (*Glycine max* L. Merrill) placées dans différentes conditions d'alimentation hydrique et de compétition intraspécifique. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie de Sciences* 286:1673-1676. 1978.
5. CASTRO, P. R. C. e GUTIERREZ, L. E. Chemical changes in *Gossypium hirsutum* L. cv. IAC-17 after treatment with growth regulators. *Supplement to Plant Physiology* 65:100. 1980.
6. GOMES, P. A. soja. São Paulo, Livraria Nobel, 1975. 152 p.
7. GOWDA, P. M. Effects of certain cultural and chemical treatments on growth, productivity and seed composition of edible soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. *Dissertation Abstracts International* 33:516. 1972.
8. HOWELL, R. W. Physiology of the soybean. In A. G. NORMAN (ed.). *The soybean*. New York, Academic Press, 1963. pp. 75-124.
9. HOWELL, R. W., WARGEL, C. J., BRIM, C. A., HARTWIG, E. E., LAMBERT, J. W., THOMPSON, J. R., STEFANSSON, B. R., PARK, J. K., SEIGLER, W. E. e WEBB, B. K. Response of soybeans to seed-treatment with gibberellin under simulated commercial conditions. *Agronomy Journal* 52:144-146. 1960.
10. HUMPHRIES, E. C. Effects of (2-cloroethyl) trimethylammonium chloride on plant growth, leaf area, and net assimilation rate. *Annals of Botany* 27:517-532. 1963.
11. SOUZA, B. H., GANDOLFI, V. H. e REPENNING, I. S. Aplicação do ácido giberélico em soja. *Relatório do Instituto de Pesquisas Agronômicas*, 1973. 4 p.
12. SPACKMAN, D. H., STEIN, W. H., e MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Analytical Chemistry* 30:190-1206. 1958.

M. A. ROCHA-PEÑA*
C. T. MONREAL*
E. N. BECERRA*
P. RUIZ*

Summary

*An outbreak of maize mosaic virus (MMV) occurred in corn fields at Nacajuca, Tabasco in Mexico on March of 1981. Disease incidence was about 70%, and yield of infected plants was severely reduced. Virus identification was based on host symptoms, particle morphology, reactivity of infected plant sap with a MMV-anti-serum in Ouchterlony double diffusion tests, and transmission by field collected *Peregrinus maidis* planthoppers. The disease was also recorded in corn fields of other locations of Tabasco, such as Cardenas, Huimanguillo and Emiliano Zapata, but at very low incidences.*

Introducción

El virus del mosaico del maíz (maize mosaic virus) (MMV) es un patógeno importante que afecta al cultivo del maíz (*Zea mays* L.) en diversas zonas tropicales del mundo (5). En el Continente Americano, el virus ha sido descrito en Venezuela (6, 7), Perú (9), Suriname, Puerto Rico y Cuba (5); en donde comúnmente se conoce con el nombre de "virus del enanismo rayado" (6, 7). En México, el mosaico del maíz ha sido consignado hasta ahora como una enfermedad esporádica en los Estados de Campeche, Chiapas, Tabasco, Yucatán y Quintana Roo (1). En marzo de 1981, en el municipio de Nacajuca, Tabasco, apareció una enfermedad considerada como nueva en la región: las plantas afectadas mostraban un enanismo severo acompañado por unas rayas amarillas a lo largo de las nervaduras

La enfermedad alcanzó grados de incidencia hasta un 70% en un total de 20 hectáreas sembradas con la variedad de maíz denominada "criollo brasileño", cuya producción fue severamente afectada.

El virus del mosaico del maíz, se ha relacionado como una probable causa de la desaparición de la civilización Maya del Sureste de México y la región Norte de Guatemala, debido supuestamente a la aparición súbita del virus en los campos de maíz y a la aparente susceptibilidad de los genotipos criollos que los Mayas solían sembrar (1).

El presente trabajo informa de la ocurrencia de una epifitía en el Estado de Tabasco causada por un virus identificado como virus del mosaico del maíz.

Materiales y métodos

Transmisión por insectos

En el campo donde se presentó la enfermedad, se encontraron abundantes poblaciones del saltahojas *Peregrinus maidis* Ashm. (identificado por el Biol. Antonio Marín Jarillo, del Laboratorio de Taxonomía de Insectos, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, México) colonizando las plantas de maíz. Se capturaron individuos presentes en aquellas que mostraban los síntomas de la enfermedad y

1 Recibido para publicación el 4 de octubre de 1983. Aprobado para su publicación por el Director General del Colegio Superior de Agricultura Tropical. Los autores agradecen a la Dra. Elizabeth Cárdenas en las observaciones al microscopio electrónico.

* Colegio Superior de Agricultura Tropical, Departamento de Fitopatología, Apartado Postal 24, Cárdenas, Tabasco, 86500 México. Domicilio actual del Primer autor, Dirección General de Sanidad Vegetal, S.A.R.H., Carlos Salazar No. 2506 Pte., Monterrey, Nuevo León, 64000 México.

fueron traídos al laboratorio para efectuar ensayos de transmisión. Se hicieron 10 grupos de insectos y se confinaron mediante jaulas y por separado en 10 plántulas de maíz sanas. Como planta prueba se utilizó la variedad "criollo papaloapan" y las inoculaciones se efectuaron cuando las plantas estaban en el estadio de 1 ó 2 hojas. Cinco días después del confinamiento con los insectos, las plantas inoculadas se asperjaron con un insecticida sistemático y se mantuvieron en el invernadero por espacio de 2 meses para la observación de síntomas.

Microscopía electrónica

Para observar la presencia de partículas virales en muestras de tejido enfermo se utilizó la técnica de tinción negativa. Pequeñas porciones de hojas de maíz infectadas se contrastaron con ácido fosfotúngstico 2%, pH 7.0, se aplicaron sobre rejillas de microscopía electrónica previamente cubiertas con formvar y se examinaron en un microscopio Carl Zeiss EM 9 S-2 a 9 400 y 23 700 aumentos. La misma metodología se efectuó utilizando como testigo hojas de maíz sanas.

Serología

Se efectuaron pruebas serológicas en doble difusión en agar, reaccionando en varias combinaciones savia de plantas enfermas y savia de plantas sanas con los antisueros correspondientes a los virus del mosaico del maíz y del rayado fino (VRF); gentilmente proporcionados por el Dr. Ramón Lastra (Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas) y por el Dr. Rodrigo Gámez (Universidad de Costa Rica) respectivamente.

Resultados

En los ensayos de transmisión con insectos, entre 10 y 15 días después del confinamiento, en 4 de las 10 plantas inoculadas aparecieron unos puntitos pequeños y rayas finas amarillas a lo largo de las nervaduras. Posteriormente, las rayas se tornaron más gruesas, se extendieron en toda la hoja y finalmente las plantas murieron. El examen de las muestras enfermas realizado en el microscopio electrónico, reveló la presencia de partículas baciliformes con un tamaño alrededor de 245 x 50 nm. En las pruebas serológicas en doble difusión, se formaron bandas de precipitación entre la savia de plantas enfermas y el antisuero correspondiente al virus del mosaico del maíz (Figura 1). Con la savia de plantas sanas y con el antisuero del virus del rayado fino no ocurrió ningún tipo de reacción.

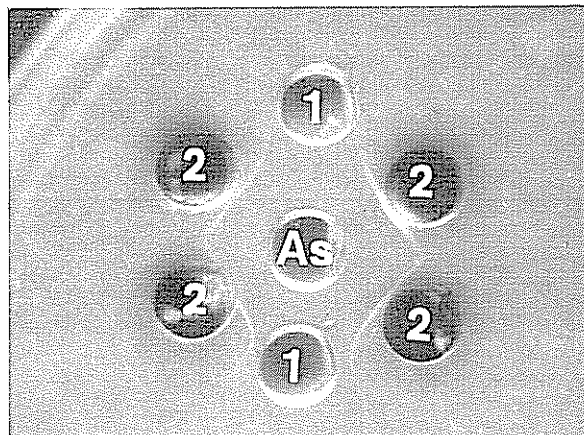


Fig. 1. Reacción serológica en doble difusión en agar entre savia de maíz con el antisuero del virus del mosaico del maíz (maize mosaic virus). 1 - Savia de plantas sanas; 2 - Savia de plantas enfermas; As - Antisuero del MMV.

Discusión

Los resultados obtenidos en cuanto a morfología y tamaño de las partículas virales, reacción serológica positiva con el antisuero del MMV, así como la transmisión mediante *Peregrinus maidis*, indican al virus del mosaico del maíz como el agente causal de la epifitía aparecida en el municipio de Nacajuca, Tabasco. Los síntomas mostrados por las plantas enfermas, ya sea en el campo o en las inoculadas experimentalmente con insectos, tienen un patrón muy semejante a los síntomas severos ocasionados por el virus del rayado fino, el cual también está presente en el Estado de Tabasco (11). Sin embargo, este último por lo general produce síntomas menos severos y en ocasiones poco conspicuos en los materiales del tipo criollo (2, 11). La diferencia fundamental radica en que las partículas del VRF son polihédricas y su transmisión se efectúa mediante los saltahojas *Dalbulus maidis* DeL. & W. y *Dalbulus elimatus* Ball entre otros (2, 8, 11), pero no por *Peregrinus maidis* (2, 10). El virus de la hoja blanca del maíz (maize stripe virus) reportado en Venezuela (3, 6, 13), Perú (9) y recientemente en el vecino Estado de Florida en Estados Unidos (3), también es transmitido por *P. maidis* (3, 6, 13), pero su etiología al parecer está relacionada con una nucleoproteína filamentososa (4) y además, produce una sintomatología diferente en plantas de maíz (3, 6, 13).

El sitio donde se presentó la epifitía causada por el virus del mosaico del maíz, comprende una superficie restringida de 20 hectáreas divididas mediante un sistema de camellones de 200 x 20 metros, rodeados por el agua de una laguna (12). En ese lugar se observaron abundantes poblaciones de *Peregrinus maidis*.

colonizando las plantas de maíz, en compañía de una gran cantidad de hormigas *Paratrechina* sp (Hymenoptera: Formicidae) (Identificadas por el Dr. A. P. Bhatkar del Colegio Superior de Agricultura Tropical, México), las cuales al parecer cuidaban a los individuos de *P. maidis*. En otras plantaciones de maíz en los municipios de Cárdenas, Huimanguillo y Emiliano Zapata, se han registrado síntomas de "enanismo rayado" pero con incidencias inferiores al 0.01% (M. A. Rocha, observaciones personales, 1981)

Debido al peligro potencial que representa esta enfermedad para la producción de maíz en el Estado de Tabasco y para otras áreas tropicales de México, actualmente se estudia la susceptibilidad al virus en diversos genotipos de maíz, así como el papel de las hormigas sobre las poblaciones de *Peregrinus maidis*.

Resumen

En diversas plantaciones de maíz sembradas en el municipio de Nacajuca, Tabasco, México, en marzo de 1981 apareció una epifitía causada por el virus del mosaico del maíz (maize mosaic virus) (MMV). La incidencia de la enfermedad alcanzó cerca del 70% de plantas infectadas, las cuales mostraron una escasa producción de grano. La identificación del virus se basó en síntomas de plantas enfermas, morfología y tamaño de las partículas virales, reacción serológica positiva entre savia de plantas infectadas y un antisuero preparado para el MMV; y por la transmisión de la enfermedad por saltahojas *Peregrinus maidis* colectados en el campo. Los síntomas de la enfermedad se registraron en otros campos de maíz en los municipios de Cárdenas, Huimanguillo y Emiliano Zapata, pero con incidencias sumamente bajas.

Literatura citada

1. BREWBAKER, J. L. Diseases of maize in the wet lowland tropics and the collapse of the classic maya civilization. *Economic Botany* 33:101-118 1979.
2. GAMEZ, R. Rayado fino disease of maize in the American tropics. *Tropical Pest Management* 26:26-33 1980.
3. GINGERY, R. E., NAULT, L. R., TSAI, J. H., and LASTRA, J. Occurrence of maize stripe virus in the United States and Venezuela. *Plant Disease Reporter* 63:341-343 1979.
4. GINGERY, R. E., NAULT, L. R. and BRADFUTE, O. E. Maize stripe virus: Characteristics of a member of a new virus class. *Virology* 112:99-108 1981.
5. HEROLD, F. Maize mosaic virus. CMI/AAB Description of plant viruses No 94 Commonwealth Agricultural Bureaux/Association of Applied Biologists. Kew Surrey, England 1972.
6. LASTRA, R. Maize mosaic and other maize virus and virus-like diseases in Venezuela. Pags 30-39. In: L. E. Williams, D. T. Gordon and L. R. Nault (Ed.) Proceedings International Maize Virus Disease Coll and Workshop. Ohio Agricultural Research and Development Center, Wooster, Ohio 1976. 145 p.
7. MALAGUTI, G. El enanismo rayado del maíz en Venezuela. *Agronomía Tropical (Maracay)* 12:175-193 1963.
8. NAULT, L. R. and BRADFUTE, O. E. Reevaluation of leafhopper vectors of corn stunting pathogens. *Proceedings of American Phytopathology Society* 4:172. 1977 (Resumen).
9. NAULT, L. R., GORDON, D. T., GINGERY, R. E., BRADFUTE, O. E. and CASTILLO-LOAYZA, J. Identification of maize viruses and mollicutes and their potential insect vectors in Peru. *Phytopathology* 69:824-828 1979.
10. PANIAGUA, R. y GAMEZ, R. El virus del rayado fino del maíz: Estudios adicionales sobre la relación del virus y su insecto vector. *Turrialba* 26:39-43 1976.
11. ROCHA-PEÑA, M. A. Algunos aspectos relacionados con el virus del rayado fino del maíz en México. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados Chapingo, México. 1981. 55 p.
12. ROMERO-BAUTISTA, S. Estudio para la implementación de una tecnología de chinampas tropicales. Informe Técnico. Colegio Superior de Agricultura Tropical, Departamento de Ecología. Cárdenas, Tabasco, México. (Mimeografiado) 1981. 32 p.
13. TRUJILLO, G. E., COSTA, J. M. and PIÑERO, A. A new corn virus disease found in Venezuela. *Plant Disease Reporter* 58:122-126 1974.

Notas y comentarios

US-AID Supports Study of Honduras Pine in the Caribbean

Large reforestation efforts are being undertaken with exotic forest plantation tree species in the Caribbean region. Often, specific site requirements for best growth are not known for the individual species planted. Excessive foxtailing, crooked stems, poor form, and dieback are general indicators of "off site" plantings. Such observations are now quite extensive for the widely planted species, *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, known locally as Honduras or Caribbean pine. However, there has traditionally been little technical information exchange for over 30 years between Caribbean countries where this pine has been planted.

In early 1983 a major step towards resolving this problem was the awarding of a \$ 150 000 research grant from US-AID to study growth and site relationships of Caribbean pine in Jamaica, Surinam, Trinidad, and Venezuela. Methodologies were developed in Puerto Rico by Leon H. Liegel. He and counterparts in all four cooperator countries will undertake four major grant objectives over a 3-year

period ending December 1985: 1) collect, analyze, and synthesize existing but nonpublished data on Caribbean pine, 2) identify and complete various forestry training activities for local technical or scientific staff of cooperator institutions, 3) conduct new field research to refine soil/site interpretations for Caribbean pine, and 4) publish and disseminate results from synthesis and new field research activities.

The grant fosters integrated forest development in all cooperator countries. It will develop comprehensive site interpretations for Caribbean pine that have regional as well as world-wide significance. Data synthesis, training, and cooperative research efforts will provide quantitative data that can be used by managers, foresters, ecologists, and economists for rational decision making.

To make interpretations and analyses as complete as possible, Liegel is soliciting information from others in the Caribbean region and elsewhere. Of particular interest are unpublished data on Caribbean pine growth and yield as related to local soils or other environmental variables and seed production, foxtailing, and wind damage in plantations of known age and seed source.

Write: L. H. Liegel, USDA Forest Service, P. O. Box AQ, Rio Piedras, Puerto Rico 00928.

SOME PROPERTIES OF A COWPEA SEVERE MOSAIC VIRUS ISOLATE FROM TABASCO, MEXICO¹ /

M. A. ROCHA-PEÑA*
J. P. FULTON**

Resumen

Se presentan los resultados de una caracterización parcial del virus del mosaico severo del caupi (cowpea severe mosaic virus) identificado en el Estado de Tabasco, México. El virus (CSMV-Tabasco) infectó 14 genotipos de caupi, incluyendo 6 variedades cultivadas en Tabasco, las cuales reaccionaron produciendo lesiones locales en las hojas inoculadas, seguidas por un mosaico sistémico. los genotipos Macaibo y PI-186465 se comportaron como inmunes al virus. Otros hospedantes susceptibles fueron: Canavalia ensiformis, Glycine max, Lupinus albus, Phaseolus lunatus, P. vulgaris, Vigna radiata, Chenopodium quinoa, Nicotiana benthamiana, N. rustica, N. tabacum y Vinca rosea. Se encontró un punto térmico de inactivación entre 60 y 65°C, un punto máximo de dilución entre 10⁻⁵ y 10⁻⁶ y un envejecimiento in vitro de 11 días a 22-24°C. En muestras de virus purificadas se observaron numerosas partículas poliédricas de alrededor de 25 nm de diámetro. En pruebas serológicas en doble difusión en agar, se encontró que el CSMV-Tabasco está estrechamente relacionado con el CSMV-Arkansas y con otros aislamientos del virus de Puerto Rico, El Salvador y Venezuela, sin embargo, se distingue de algunos de ellos por la formación de espolones en las bandas de precipitación.

Introduction

Cowpea severe mosaic virus (CSMV) (5) is an important beetle-transmitted pathogen of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) throughout warm temperate and tropical zones of the American continent, where it has long been known (4). CSMV has been recorded in the United States (21), El Salvador (7), Costa Rica (10, 24), Venezuela

(6), Suriname (12), Brazil (14), Cuba (13), Puerto Rico (19), Trinidad (4), and likely it is present in other Latin American countries. Field incidence of CSMV may reach 100% of infected plants (4, 10, 14, 24) and severe infections can result in a 50-90% reduction in the yield (6, 14, 25). At present, CSMV is confined to North, Central and South America and associated lands in the western hemisphere (5, 9). Cowpea (yellow) mosaic virus (CPMV) refers to another comovirus occurring primarily in Africa (8, 9). In 1979, in the Tabasco state in Mexico, CSMV was isolated and identified from field collected cowpea plants showing foliar mosaic and distortion symptoms (17). Identification was based on sap inoculation, beetle transmission and by reaction with a CSMV-antiserum from Brazil. This paper reports additional data on the Tabasco isolate of CSMV, as well as its serological relationship to the CSMV-Arkansas and to other isolates of the virus from several Latin American countries.

Materials and methods

Host reactions: Sixteen cowpea and seven bean genotypes, as well as other legumes and non-legumes,

1 Received for publication in May 3, 1983.
This research was partially supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México; contract PCAFBNA-001285. The authors are grateful to Rodrigo A. Valverde for technical assistance, and thank A. Díaz, J. R. Lastra and N. G. Vakili for providing isolates of CSMV from El Salvador, Venezuela and Puerto Rico.

* Published with the approval of the Director of Colegio Superior de Agricultura Tropical and the Director of the Arkansas Agricultural Experiment Station Apartado Postal 24 Cárdenas, Tabasco 86500, Mexico.

** Department of Plant Pathology, Virology and Bio-control Laboratory University of Arkansas Fayetteville, Arkansas 72701, USA.

were tested in the greenhouse for their reaction to the virus. The plants were mechanically inoculated with sap of infected cowpea and observed 2-3 weeks for symptoms. The presence of the virus was determined by the Ouchterlony gel diffusion test (18) and by inoculation to healthy cowpea plants.

Physical properties: Thermal inactivation point, dilution end point and longevity *in vitro* (at 22-24°C), were determined in sap of infected Monarch cowpea plants, 8-10 days after inoculation, according to the suggested procedures for legume viruses (2). *Canavalia ensiformis* DC. was used as a test plant.

Purification: The virus was purified using a modification of the Steere's chloroform-butanol method (22). Infected tissue of Monarch cowpea, 8-10 days after inoculation, was homogenized in a Waring blender with 15 ml of 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2, containing 0.1 M ascorbic acid, and 10 ml of the chloroform and n-butanol mixture (1:1) per gram of tissue. The resulting extract was held overnight at room temperature and centrifuged at 5 000 g for 10 min to remove cellular debris. The supernatant was subjected to three alternate high (80 000 g for 90 min the first and 60 min the second and third) and two low (5 000 g for 10 min) speed centrifugations. The high speed pellets were resuspended in 0.01 M phosphate buffer, pH 7.2.

Electron microscopy: Purified preparations of the virus were mixed with an equal volume of 2% phosphotungstic acid, pH 5.7 and applied to formvar coated grids. The virus was observed in a JOEL JEM-100 CX electron microscope at 33 000 and 66 000 magnifications.

Serology: Antiserum to the virus was developed in rabbits, by 4 subcutaneous infections at weekly intervals with an emulsion of purified virus and Freund's incomplete adjuvant. The animals were bled about 2 months after the last infection, by nicking the marginal ear vein. The antiserum was recovered, mixed with an equal volume of glycerol and kept in a freezer. The CSMV isolates from Tabasco, Arkansas, Puerto Rico, El Salvador and Venezuela, each in sap from infected Monarch cowpea, were reacted in various combinations with antisera for both CSMV Tabasco and CSMV-Arkansas, using the Ouchterlony gel diffusion test for determining their relationship.

Results

Host reactions: The results of host reactions are summarized in Table 1. Fourteen cowpea genotypes were susceptible to the virus and most reacted with

the production of chlorotic local lesions on the inoculated primary leaves, followed by the development of a severe mosaic, with distortion and blistering on the trifoliate leaves. The accessions Macaibo and PI-186465 remained symptomless under our test conditions and no infection was detected in repeated attempts by serology or back inoculation.

All the bean cultivars tested were susceptible to the virus and reacted with the production of either necrotic or chlorotic local lesions on the inoculated primary leaves. The Top Crop bean showed no systemic symptoms, but the infection was detected on the trifoliate leaves.

Table 1. Reaction of plant species following mechanical inoculation with the Tabasco isolate of cowpea severe mosaic virus^a.

Species inoculated	Symptoms produced ^b
Legumes	
<i>Canavalia ensiformis</i> D.C.	LLn
<i>Glycine max</i> (L.) Merr Lee	S
<i>Lupinus albus</i> L.	S
<i>Phaseolus lunatus</i> L. Henderson	LLc, S
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	
Black Turtle	LLn
Bountiful	LLc
Kentucky Wonder	LLn
Pinto	LLn
Pinto 3	LLnc
Top Crop	LLn
Viva Pink	LLn
<i>Vigna radiata</i> (L.) Wilczek	LLc, S
<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.	
Blackeye	LLc, S
Chinese Red	LLc, S
Crimson	LLc, S
Criollo "carita"	LLc, S
Criollo "castilla"	LLc, S
Criollo "castilla punto cafe"	LLc, S
Criollo "negro"	S
Criollo "pucuy"	LLc, N, S
Criollo "sin tiempo"	LLc, S
Georgia 21	LLc, S
Macaibo	-
Monarch	LLc, S
PI 186465	-
PR-Black	LLc, S
PI 293466	LLc, S
PI 293514	LLc, S

Table 1. Continuation . . .

Species inoculated	Symptoms produced ^b
<i>Vicia faba</i> L. Bush Fava	--
Non Legumes	
<i>Chenopodium quinoa</i> Willd	LLc
<i>Cucumis sativus</i> L. Model	--
<i>Cucurbita pepo</i> L. Small Sugar	--
<i>Nicotiana benthamiana</i> Domin.	LLc, S
<i>Nicotiana rustica</i> L.	LLc
<i>Nicotiana tabacum</i> L.	-- ^c
<i>Vinca rosea</i> L.	S

a Virus was transmitted mechanically by rubbing infected sap on carborundum-dusted leaves with a cheese-cloth pad.

b Indicates no reaction observed; LLc = chlorotic local lesions; LLn = necrotic local lesions; S = systemic reaction as a severe mosaic or mild mottle; N = necrosis and collapse of the epycotil

c Systemic infection was detected by back inoculation to healthy cowpea plants.

The other hosts susceptible to the virus were: soybean (*Glycine max* (L.) Merr., "Lee"), jack bean (*Canavalia ensiformis* DC), white lupine (*Lupinus albus* L.), lima bean (*Phaseolus lantus* L. "Henderson"), mung bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek), *Chenopodium quinoa* Willd, *Nicotiana benthamiana* Domin, *Nicotiana rustica* L., *Nicotiana tabacum* L. and *Vinca rosea* L. No symptoms were observed and no infection was detected on broad bean (*Vicia faba* L. "Bush Fava"), cucumber (*Cucumis sativus* L. "Model") and squash (*Cucurbita pepo* L. "Small Sugar").

Physical properties: The *in vitro* properties of the virus were as follows: thermal inactivation, infection at 60°C, but none at 65°C. dilution, infection at 10⁻⁵, but none at 10⁻⁶. longevity *in vitro*, infection at 11 days, but none at 12 days

Electron microscopy: The electron microscopic observations of purified preparations of the virus showed polyhedral particles of about 25 m in diameter (Figure 1)

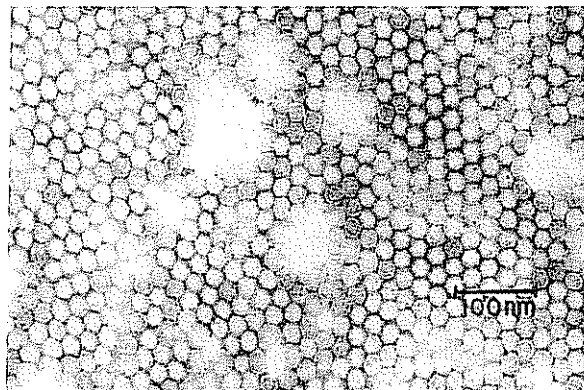


Fig 1 Electron micrograph of a purified preparation of CSMV-Tabasco, stained with 2% phosphotungstic acid, pH 5.7

Serology: The antiserum prepared to the virus had a titer of 1:512 in gel double-diffusion tests. No reaction was detectable with healthy cowpea sap. The better reactions were obtained when the antiserum was diluted at 1:16 and 1:32. Results of the serological tests are shown in Figure 2. All the CSMV isolates produced strong lines of precipitation with both CSMV antisera, indicating a close serological affinity among them. When using CSMV-Tabasco antiserum, its homologous antigen formed spurs with the isolates of Puerto Rico and Venezuela, but not with those of Arkansas and El Salvador (Figure 2a). When the CSMV-Arkansas antiserum was used, however, its homologous antigen formed spurs with all the isolates tested, including that of Tabasco (Figure 2b). Additionally, some heterologous isolates formed spurs with one another using both antisera.

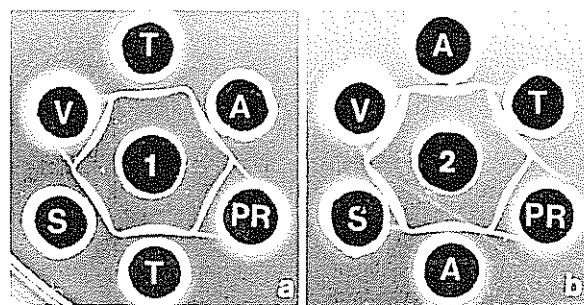


Fig 2. Agar double-diffusion tests showing reactions of CSMV-Tabasco and CSMV-Arkansas with other CSMV isolates. Center wells contain antiserum to: 1- CSMV-Tabasco; 2- CSMV-Arkansas. Peripheral wells contain sap of cowpea plants infected with CSMV isolates from: T- Tabasco; A- Arkansas; PR- Puerto Rico; S- El Salvador; V- Venezuela

Discussion

The results reported here confirmed the presence of the cowpea severe mosaic virus in the State of Tabasco in Mexico. The host reactions, as well as the physical properties of this isolate (CSMV-Tabasco), are similar to those reported by other investigators for various CSMV isolates from different countries (4, 6, 13, 19, 21). Slight differences, however, were noted. In host reactions, for example, the CSMV-Tabasco was found to infect Top Crop bean and *Vinca rosea*, whereas the Arkansas isolate of the virus failed to infect these hosts (21). The isolates of CSMV from Trinidad (4), Cuba (13) and Puerto Rico (19) did not infect *Nicotiana tabacum*, which, although no symptoms were observed after inoculation with CSMV-Tabasco, the virus was recovered by back inoculation to healthy cowpea plants.

Of the sixteen cowpea genotypes tested, only the cultivar Macaibo from Brazil and the line PI-186465 from Nigeria were immune to CSMV-Tabasco. Both genotypes have been reported as resistant to several CSMV isolates from diverse geographical origins (8, 14, M. T. Lin, personal communication); therefore, they could be a useful source of resistance in cowpea breeding programs against CSMV. The six cowpea cultivars grown in Tabasco state (Carita, Castilla, Castilla Punto Cafe, Negro, Pucuy, and Sin Tiempo) were susceptible to the virus.

Nicotiana benthamiana, *N. rustica* and *Lupinus albus*, three plant species previously not tested as hosts of CSMV (3, 4, 6, 13, 19, 21), were susceptible to CSMV-Tabasco.

There were also some differences in physical properties of CSMV-Tabasco to those reported for other CSMV isolates (4, 6, 13, 19, 21); but such small differences often depend on the source, assay hosts, and experimental conditions (5), and are probably not significant.

The Ouchterlony gel diffusion tests showed that CSMV-Tabasco is closely related, but not identical serologically, to CSMV-Arkansas and to other CSMV isolates tested from Puerto Rico, El Salvador and Venezuela. When CSMV-Tabasco antiserum was used, no serological difference was found between the Tabasco isolate and those of Arkansas and El Salvador. However, when using CSMV-Arkansas antiserum, Arkansas and Tabasco isolates appeared to be different serologically, as shown by a fine spur beyond the point of coalescence of the precipitation bands between the two isolates (Figures 2a-b). These reactions indicate that the Arkansas isolate contains additional antigenic determinants not present in the

Tabasco isolate. Homologous antisera for isolates from Puerto Rico, El Salvador and Venezuela were not available for comparison.

Spur formation between CSMV isolates with different geographical origins has been noted (9). Fourteen isolates of CSMV collected in central Brazil were separated by immunodiffusion into two serologically distinct groups, which also showed slight differences in host range (16).

CSMV causes an important and widespread beetle-transmitted disease of cowpea in many parts of tropical America (4, 5, 6, 10, 12, 13, 14, 19, 25). Natural infections of this virus also occur in *Phaseolus vulgaris* L. (1), soybeans (4, 24), winged bean (11), pigeon pea (4), and several tropical leguminous weeds, such as *Macroptilium lathyroides* (L.) Urb. (1, 4), *Centrosema pubescens* Benth., *Calopogonium mucunoides* Desv. (15) and *Vigna vexillata* (L.) A. Rich. (24), which have been regarded as reservoirs of the CSMV in the field (1, 8, 14, 15, 24). In Tabasco state in Mexico, field incidence of CSMV often reaches 50-95% (17). The symptoms shown by most of the cowpea genotypes after inoculation with CSMV-Tabasco indicate that it is a severe isolate of CSMV. Differences in aggressiveness among CSMV isolates from diverse geographical origins have already been emphasized (8, 23). Studies on the epidemiology and importance of the CSMV-Tabasco are in progress.

Summary

Host reactions, physical properties and serology of a cowpea severe mosaic virus isolate from Tabasco, Mexico (CSMV-Tabasco) are presented. Fourteen cowpea genotypes, including six cultivars grown in Tabasco, were susceptible to the virus and reacted with the production of local lesions on the inoculated primary leaves, followed by the development of a severe mosaic on the trifoliate leaves; the cowpea accessions Macaibo and PI-186465 were immune to CSMV-Tabasco infections. Other hosts susceptible to the virus were: *Canavalia ensiformis*, *Glycine max*, *Lupinus albus*, *Phaseolus lunatus*, *P. vulgaris*, *Vigna radiata*, *Chenopodium guinoa*, *Nicotiana benthamiana*, *N. rustica*, *N. tabacum* and *Vinca rosea*. Thermal inactivation was between 60 and 65°C; dilution, between 10⁻⁵ and 10⁻⁶; longevity *in vitro* at 22-24°C, 11 days. Electron microscopic observations of purified preparations showed polyhedral particles of about 25 nm in diameter. Agar double-diffusion serology demonstrated that CSMV-Tabasco is closely related, but not identical, to CSMV-Arkansas and to other CSMV isolates from Puerto Rico, El Salvador and Venezuela.

Literature cited

1. ALCONERO, R. and SANTIAGO, A. *Phaseolus lathyroides* as a reservoir of cowpea mosaic virus in Puerto Rico. *Phytopathology* 63: 120-123
2. BOS, L., HAGEDORN, D. J., and QUANTZ, L. Suggested procedures for international identification of legume viruses. *Tidsehr. Plantenziekten* 66:328-343 1960
3. CHANT, S. R. Further studies on the host range and properties of Trinidad cowpea mosaic virus. *Annals of Applied Biology* 50:159-162 1962
4. DALE, W. T. Observations on a virus disease of cowpea in Trinidad. *Annals of Applied Biology* 36:327-333 1949
5. DE JAGER, C. P. Cowpea severe mosaic virus CMI/AAB. Description of plant viruses No. 209. Commonwealth Agricultural Bureaux/Association of Applied Biologists, Kew, Surrey, England, 1979
6. DEBROT, E. and BENITEZ DE ROJAS, C. E. El virus del mosaico del frijol, *Vigna sinensis* Endl. (Cowpea Mosaic Virus) en Venezuela. *Agronomía Tropical (Maracay)* 17:3-15. 1967.
7. DIAZ, A. J. Estudio y caracterización de un mosaico del frijol de costa (*Vigna sinensis*) en El Salvador. *Phytopathology* 62:754 (Abstract) 1972
8. FULTON, J. P. and ALLEN, D. J. Identification of resistance to cowpea severe mosaic virus. *Tropical Agriculture (Trinidad)* 59:66-68 1982.
9. FULTON, J. P. and SCOTT, H. A. A serogrouping concept for legume comoviruses. *Phytopathology* 69:305-306 1979
10. GONZALEZ, C., MORENO, R. and GAMEZ, R. Identification, incidence and distribution of a virus of bean (*Vigna sinensis*) in Costa Rica. *Proceedings of the American Phytopathology Society* 2:75. (Abstract) 1975
11. KITAJIMA, E. W., NODA, H., LIN, M. T. and COSTA, C. L. Um mosaico em freijão-de-asa (*Psophocarpus tetragonolobus*) causado por um isolado do sub grupo severo do vírus do mosaico da *Vigna*. *Fitopatologia Brasileira* 4:519-524. 1979
12. KLAS, F. E. Cowpea severe mosaic virus: a constraint on the improvement of cowpea cultivation in Suriname. *Paramaribo Agricultural Station Bulletin No 104* 1979. 22 p.
13. KVICALA, B. A., SMRZ, J. and BLANCO, N. Some properties of cowpea mosaic virus isolated in Cuba. *Phytopathologische Zeitschrift* 68:223-235 1969
14. LIMA, J. A. A. and NELSON, M. R. Etiology and epidemiology of mosaic of cowpea in Ceara, Brazil. *Plant Disease Reporter* 61: 864-867 1977
15. LIN, M. T., ANJOS, J. R. N. and RIOS, G. P. Natural occurrence of serotype I of "cowpea mosaic virus - Arkansas serogroup" in *Centrosema pubescens* and *Calopogonium mucunoides* at the central Brazil. (in Portuguese). *Fitopatologia Brasileira* 5:148 (Abstract) 1980
16. LIN, M. T., ANJOS, J. R. N. and RIOS, G. P. Serological grouping of cowpea severe mosaic virus isolates from central Brazil. *Phytopathology* 71:435-438. 1981
17. MONREAL, C. T. Identificación del agente causal de una virosis en *Vigna sinensis*. Resúmenes de Seminarios de Primavera. Colegio Superior de Agricultura Tropical. Departamento de Fitopatología. Cardenas, Tabasco, México (unpublished) 1981
18. OUCHTERLONY, O. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis II. *Progress in Allergy* 6:30-154 1962
19. PEREZ, J. E. and CORTES-MONLLOR, A. A mosaic of cowpea from Puerto Rico. *Plant Disease Report* 54:212-216 1970
20. PAGUIO, O. R. Cultivar reactions and effect of production of cowpea infected with the Pernambuco isolate of cowpea severe mosaic virus (in Portuguese). *Fitopatologia Brasileira* 5:435-436 (Abstract) 1980
21. SHEPHERD, R. J. Properties of a mosaic virus of cowpea and its relationship to the bean pod mottle virus. *Phytopathology* 54:466-473 1964.

- 22 STEERE, R. L. Purification and properties of tobacco ring spot virus. *Phytopathology* 46:60-69 1956
- 23 THONGMEEAROKOM, P. and GOODMAN, R. M. A severe disease of soybeans caused by an isolate of cowpea mosaic virus. *Proceedings of American Phytopathology Society* 3:209-210. 1976
- 24 VALVERDE, R. A., MORENO, R. and GAMEZ, R. Incidence and some ecological aspects of cowpea severe mosaic virus in two cropping systems in Costa Rica. *Turrialba* 32:29-32. 1982.
- 25 VALVERDE, R. A., MORENO, R., and GAMEZ, R. Yield reduction in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) infected with cowpea severe mosaic virus in Costa Rica. *Turrialba* 32:89-90 1982.

Reseña de libros

HODGSON, J. M. Soil sampling and soil description (reprinted). Oxford University Press, Great Britain 1982. 241 p.

El tomar muestras de suelos y describir el sitio y el suelo de donde provienen, siempre ha sido un trabajo de especialistas. Desafortunadamente en nuestras latitudes los "especialistas", en muchos casos, aprenden por prueba y error y muchos otros toman muestras de suelos sin conocer del asunto. En este sentido podría mencionarse que en la literatura se encuentra mucha contaminación con información poco significativa por su representabilidad.

Hodgson presenta una obra simple y de fácil manejo; por su aporte fundamental consiste en proporcionar un complemento, primeramente publicado en 1978, a los esfuerzos iniciales del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (Handbook 18) y de la FAO (Guías para la descripción de perfiles de suelos).

La presentación del material es excelente e incluye (i) una introducción histórica de este campo, (ii) un capítulo sobre el equipo necesario para la preparación del sitio de muestreo y la ejecución en este paso, (iii) la escogencia y caracterización del sitio, (iv) la descripción del suelo, (v) las formas de anotar la información del sitio y del suelo, (vi) la manera de tomar

muestras (disturbadas y sin disturbar) y (vii) un capítulo comparando los métodos empleados en diversas partes del mundo, que ocupa la mitad del texto.

Tanto la presentación como la claridad del contenido del libro permiten a personas que se inician en la ciencia del suelo estimar la necesidad de efectuar un trabajo cuidadoso. Desde el punto de vista didáctico, le ahorra al maestro el copilar y resumir un material que de por sí es de difícil acceso. Hodgson insiste en que "no existe un sistema ideal para describir sitios y suelos", es más, duda de que sea necesario un sistema único; pero fundamenta su libro en la necesidad de un lenguaje internacional que facilite la comunicación entre científicos.

En términos generales el capítulo final, en el cual se comparan los sistemas empleados en países y organizaciones seleccionadas, es el más interesante por la gran cantidad de información contenida. La comparación de sistemas de clases textuales incluida, representa un bello ejemplo del ingenio humano y una razón del porqué se debe tender hacia la uniformidad de criterios.

Como las otras monografías sobre cartografía de suelos de Oxford University Press (ver *Turrialba* 33(4):405 1983), la presente es una contribución valiosa para las personas que laboran en este campo del saber.

ALFREDO ALVARADO
FACULTAD DE AGRONOMIA
UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

COMUNICACIONES

El rambután (*Nephelium lappaceum*); composición química del fruto y su conservación.

Summary. The chemical composition of seed, flesh (aril) and peel of rambutan (*Nephelium lappaceum*) is reported for three different stages of maturity. Some morphological characteristics which differences it from *Litchi chinensis* are pointed out. The preservation of the peel-less fruit canned in syrup is also reported.

El rambután (*Nephelium lappaceum*) es un frutal originario del archipiélago malayo (6). El arilo, porción comestible ubicada entre la semilla y la cáscara (6, 10), se caracteriza por un sabor dulce y delicado, y por un color blanco translúcido muy similar al del *Litchi chinensis* (de la misma familia Sapindácea), con el que es generalmente confundido a pesar de otras características morfológicas no similares. Aunque no se sabe de frutales de *L. chinensis* en Costa Rica, el rambután es conocido como "mamón chino" y goza de gran aceptación para consumo en fresco, siendo considerado como fruta exótica.

Entre las Sapindáceas, el más destacado es el *L. chinensis* muy popular en Hawaii (3), Africa del Sur, Malasia y China, de donde se exporta enlatado hacia mercados orientales de Estados Unidos de Norteamérica (3). Mendoza (8) reporta el almacenamiento de rambután, indicando que la fruta es dañada si se almacena a temperatura menor de 7°C; de acuerdo a Pantástico (10) el fruto puede ser almacenado hasta por 25 semanas a 10°C y 90-95% H.R. con una pérdida de peso máxima de 12%. Goto (3), Miller y Bazore (9) reportan la conservación de *Litchi*, congelado y enlatado en jarabe ligero. Almeyada (1) describe el fruto de rambután y menciona que el arilo es generalmente enlatado, solo o con jugo de piña, especificaciones para el producto enlatado existen en Malasia (11).

Este trabajo reporta la composición química del fruto y los resultados de pruebas de conservación enlatando en jarabe de azúcar acidificado.

Materiales y métodos

Los frutos fueron traídos de la zona sur (tropical húmeda) de Costa Rica y analizados y enlatados dentro de las 24 horas posteriores a su recolección, tres diferentes grados de madurez fueron establecidos como sigue:

- 1 Fruta considerada como completamente madura y apta para consumo en fresco (aproximadamente 0 días previos a la cosecha) y caracterizada por una coloración externa rojiza
- 2 Fruta con aproximadamente 15 días previos a la cosecha, caracterizada por una coloración externa amarilla bien definida
- 3 Fruta con aproximadamente 30 días previos a la cosecha, caracterizada por una coloración externa verde definida pero con el fruto bien desarrollado.

Para los análisis químicos se siguieron las recomendaciones de la AOAC (4), excepto para azúcares para los que se utilizó el método de Gaines (2).

Las pruebas de enlatado se realizaron siguiendo el diagrama de la Figura 1, en latas 307 x 113, y el producto fue analizado a los 22 y 270 días posteriores a su procesamiento.

Resultados y discusión

De acuerdo a la investigación bibliográfica realizada, se hace ver que el rambután, conocido como "ma-

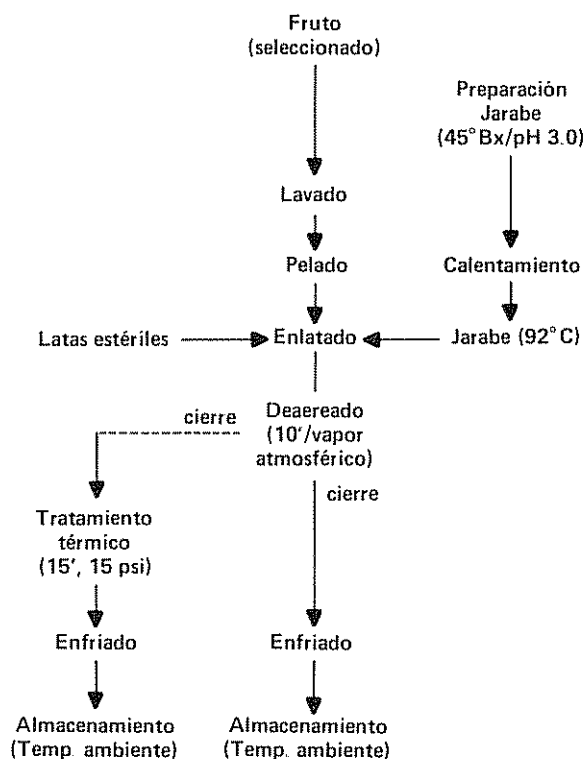


Fig 1 Sistema empleado para la conservación de rambután en jarabe enlatado.

món chino" no es un *Litchi* sp. como se cree popularmente. De acuerdo a León (6), existe similitud entre algunas características de arilo, pero otras características botánicas (Cuadro 1) permiten diferenciar a este de otras Sapindáceas

Cuadro 1. Algunas características sobresalientes de los frutos de *N. lappaceum* y *L. chinensis*¹.

	<i>N. lappaceum</i>	<i>L. chinensis</i>
Origen	Archipiélago Malayo	Sur de China
Fruto:		
-- piel	Gruesa, cubierta de tubérculos cónicos suaves (similar a espinas)	Delgada, cubierta de tubérculos planos (similar a escamas)
-- arilo	Blanco, translúcido, azucarado; adherido a la semilla, difícil de separar	Blanco, translúcido, azucarado; fácil de separar de la semilla

1 León (6) presenta una descripción completa de las características botánicas de estos dos frutales.

Según observaciones hechas, el fruto maduro empieza a deteriorarse luego de 3-4 días de almacenamiento en condiciones ambientales (aproximadamente 23°C, 80-85% H. R.) adquiriendo un color café y marcada pérdida de firmeza. Estos cambios son menos pronunciados en frutos amarillos y verdes en los cuales, luego de 4 días, solo se observó pérdida de humedad superficial caracterizada por un arrugamiento de la cáscara; este fenómeno quizá sea causado por el efecto de la baja humedad relativa (HR) que existe en San José comparada con 85-95% HR recomendada por Pantástico (10). Según este autor, la pérdida de peso por unidad de área superficial, es mayor en frutos jóvenes en los que el número de tubérculos cónicos es mayor, lo que aumentaría el área de exposición.

Conforme avanza el proceso de maduración, se observa un aumento del arilo con relación al fruto, sin embargo el peso promedio observado en el fruto (Cuadro 2) es considerablemente menor que el reportado por Pantástico (10). La variación en composición química de diferentes partes del fruto y su relación, se muestra en los Cuadros 2 a 5. Los cambios

Cuadro 2. Relaciones en peso entre los componentes del fruto¹.

Estado de madurez	Peso fruto (g)	Cantidad relativa (%) de		
		piel	pulpa	semilla
Rojo	21.00	44.34	44.83	10.83
Amarillo	18.30	44.80	40.69	14.51
Verde	-	47.22	37.12	15.66

1 Datos obtenidos de 40 y 45 frutos, en dos ocasiones, respectivamente.

Cuadro 3. Composición química en base húmeda de la pulpa (arilo) de rambután (*N. lappaceum*), para tres estados de madurez.

Componente %	Estado de madurez		
	Verde	Amarillo	Rojo
Sólidos totales	13.95	14.75	17.10
Proteína	0.40	0.75	0.60
Ceniza	0.40	0.35	0.35
Fibra	0.55	0.55	0.50
Grasa	0.1	0.1	0.1
Acidez	1.70	1.50	1.10
°Brix	16.00	17.75	19.75
pH	3.25	3.40	3.60
Azúcar total	12.90	14.65	16.60
Azúcar reductor	4.70	4.95	5.70

Cuadro 4. Composición química en base húmeda de la cáscara (piel) de rambután (*N. lappaceum*) para tres estados de madurez.

Componente (%)	Estado de madurez		
	Verde	Amarillo	Rojo
Sólidos totales	27.70	24.60	24.80
Proteína	1.90	1.90	1.70
Ceniza	0.65	0.55	0.65
Fibra	4.30	4.30	4.80
Grasa	0.25	0.20	0.15
Acidez (ácido cítrico)	2.20	1.60	1.70
pH	3.70	3.70	3.70

Cuadro 5. Composición química de la semilla de rambután (*N. lappaceum*) para tres estados de madurez.

Componente (%)	Estado de madurez		
	Verde	Amarillo	Rojo
Sólidos totales	61.55	63.40	63.35
Proteína	—	0.80	1.30
Ceniza	0.95	1.00	1.00
Fibra	3.95	4.05	4.20
Grasa	17.05	17.00	17.20
Acidez (ácido cítrico)	0.90	0.70	0.60
pH	5.15	5.35	5.50

Cuadro 6. Observaciones sobre fruta y jarabe enlatado.

Código	Jarabe	Fruta
1E	Verde-amarillento	Arilo consistente, adherido a semilla y de color natural
2E	Ligeramente amarillo	Arilo consistente, adherido a semilla ligeramente amarillo
3E	Amarillo turbio	Arilo separado de semilla y de color amarillo grisáceo.
1ET	Amarillo-verde, turbio	Arilo adherido a semilla pero poco firme
2ET	Amarillo, turbio.	Arilo unido a semilla, sin firmeza
3ET	Color rojizo, presencia partículas grasas blancas Sabor aceitoso	Arilo y semilla de color rojizo, arilo separado, sabor aceitoso.

Excepto 3ET, todos los tratamientos presentan sabor natural típico.

Estado de madurez: 1, 2, 3

Deaerado: E/Tratamiento térmico: T

en composición química, especialmente azúcares y acidez, muestran una tendencia normal con el proceso de maduración observado con base en cambios de coloración externa. El contenido de azúcar en el arilo es relativamente alto (~ 17% en el fruto maduro); esta característica es también señalada por Almayeda (1).

La semilla se caracteriza por un alto contenido de grasa (~ 17%). Este resultado, obtenido por extracción con éter de petróleo (solvente no polar), sugiere que estos compuestos grasos se encuentran ligados en forma sencilla (7), lo que facilitaría su eventual aprovechamiento (Cuadro 4)

No se observan cambios significativos en las características del jarabe o fruto luego de nueve meses de almacenamiento. El producto se ve favorecido por un bajo pH de jarabe, el cual es compatible con el sabor de la fruta. Según estos resultados, el fruto puede ser conserado con una tecnología sencilla que requiere un llenado en caliente y deaeración. Un tratamiento térmico no se justifica desde el punto de estabilidad microbiológica; por el contrario, un tratamiento térmico posterior conduce a una separación del arilo, el cual pierde consistencia afectando adversamente su apariencia. Además, se observó la presencia de gotas de grasa en el jarabe, lo cual puede ser consecuencia de movimiento de grasa de la semilla hacia el arilo y luego hacia el jarabe como resultado de la excesiva aplicación de calor; este efecto es mayor en frutos maduros

El mejor fruto para el proceso descrito es aquél que presenta coloración externa amarilla (~ 15 días antes de ser colectado para consumo en fresco). Algunas características de este producto se muestran en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Algunas características del producto enlatado (2E)*.

No frutas 11 ± 1	pH ~ 3.60 ± 10
Peso neto 212.5 ± 2.5 g	%Bx ~ 30.80 ± 3.50
Peso drenado 114.0 ± 7.0	Vacío ~ 7.1 ± 1 (plg Hg)

* Estas características permanecieron invariables -para efectos prácticos- hasta por 270 días (última evaluación)

Agradecimiento

Los autores expresan su más sincero agradecimiento al señor Delfino de la Garza quien suministrara el material para este estudio, al Dr. Goan Loo Thio del Real Instituto Tropical de Holanda, destacado en Costa Rica mediante un convenio CITA (Costa Rica) - RVB (Holanda), por sus conversaciones sobre el tema

Resumen

La composición química de la semilla, arilo y cáscara del rambután (*Nephelium lappaceum*) es reportada para tres diferentes grados de madurez. Algunas características morfológicas de este fruto se señalan para diferenciarlo del *Litchi chinensis* con el que es comúnmente confundido

Se presentan los resultados de pruebas de conservación en jarabe de azúcar enlatado.

5 de julio de 1983

A. J. ORTIZ*
O. L. CORDERO*

* Centro de Investigaciones en Tecnología de Alimentos
Universidad de Costa Rica

Literatura citada

1. ALMAYEDA, N., MAB, S. E., MARTIN, F. W. The rambutan. *Citrus and Sub-Tropical Fruit Journal* 544:10-12. (1979) *Food Science and Technology Abstract* 11(11):119. 1979.
2. GAINES, T. P. Automated determination of reducing sugars, total sugar and starch in plant tissue from one weight sample. *Journal of the AOAC* 56(6):1 419-1 424. 1973.
3. GOTO, B. Y. Lychee and its processing. In *1st Pacific Rim Food Conference Honolulu, Hawaii* 1960 pp 15-23.
4. HORWITZ, W. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 13th ed. Washington, D. C. A.O.A.C. 1980. 1 018 p.
5. HULME, A. C. (edit.) The biochemistry of fruits and their products Vol. 1. Academic Press. London. 1970 620 p.
6. LEON, J. Fundamentos botánicos de los cultivos tropicales. IICA. San José. 1968. pp. 263-268.
7. MAZLIAK, P. Lipids in Hulme, A. C. The biochemistry of fruits and their products. Vol 1 Academic Press London. 1970 620 p.
8. MENDOZA, D. B., Jr., PANTASTICO, ER. B., JAVIER, F. B. Storage and handling of rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) *Phillipine Agric* 55, 322 1972. In Pantástico, ER. B. Post-harvest physiology, handling and utilization of tropical and subtropical fruits and vegetables. Avi Westport, Conn 1975. 560 p.
9. MILLER, D. C., BAZORE, K. Fruits of Hawaii. Revised edition of Bulletin 77 University of Hawaii. 1945. 129 p.
10. PANTASTICO, ER. B. Post-harvest physiology handling and utilization of tropical and subtropical fruits and vegetables. Avi. Westport, Conn. 1975 560 p.
11. STANDARDS INSTITUTION OF MALAYSIA. Specification for canned rambutans. Malaysian standard MS8. 15:1975. 16 p *Food Science and Technology Abstract* 11(5): 247. 1979.

A further note on the introduction of *Hypsipyla* parasites in Trinidad, West Indies¹ /.

Resumen. *Hypsipyla* spp. no ha podido hasta el momento establecerse en plantaciones comerciales de caoba y cedro gracias a los esfuerzos del Departamento Forestal de Trinidad. Con el fin de controlar esta plaga el Instituto de Control Biológico del Reino Unido, Estación de las Indias Orientales consiguió material de varios parásitos — *Apanteles* spp., *Phanerotoma* sp., *Tetrastichus spirabilis*, *Antrocephalus renalis*, *Flavopimpla laniannulata*, *Afrephialtes* sp. and *Trichogrammatoidea robustae* — de la India. Algunos de estos parásitos se liberaron directamente en el campo mientras que otros se mantuvieron en cautiverio y se liberaron periódicamente. Un número razonable de *A. renalis*, *T. spirabilis*, *Phanerotoma* sp. y *T. robustae* se ha establecido sin problemas pero los otros parásitos no se han adaptado a las condiciones de Trinidad. Recientemente se han aprobado algunas recomendaciones y una extensión del programa de control biológico y el Ministerio de Agricultura ha aprobado menos fondos para obtener material de otros géneros de *H. robusta* de la India para su evolución en el laboratorio y posterior liberación en el campo.

The phycitid shootborer *Hypsipyla grandella* (Zeller) is a serious pest of meliaceous timber trees in the neotropics. Rao and Bennett (3) reviewed the literature on its importance in the Caribbean and the American mainland. In Trinidad, Spanish cedar (*Cedrela mexicana*) and mahogany (*Swietenia macrophylla*) area of commercial importance. Attempts by the Ministry of Agriculture to use them for reforestation on a plantation scale were adversely affected by *H. grandella* and also to a lesser extent by *H. ferrealis* Hmps., which is a more serious pest in the seed capsules of *Carapa guianensis*. The moths oviposit on the axillary buds of young shoots and the hatching larvae bore into the rachis. Severe damage occurs when larvae make tunnels in the tender growing points of young trees and results in retarded growth. Repeated attacks produce a witches broom effect adversely affecting the commercial quality of the timber. Control by chemical pesticides is uneconomical and difficult to achieve under prevailing conditions so that biological control is particularly desirable. The Commonwealth Institute of Biological Control (CIBC) was approached to explore the possibilities. Funds were provided in 1966 to initiate field work at the West Indian Station, CIBC to obtain stocks of exotic parasites through the Indian Station, and to breed and release them in Trinidad.

Surveys in Trinidad

After initial surveys involving sampling of infested shoots and seeds in order to assess the status of *Hypsipyla* spp. and to determine quantitatively and

qualitatively the parasite complex and its seasonal fluctuations, Bennett (3) reported large seasonal population fluctuations apparently not caused solely by changes in the number of susceptible shoots and also found that the parasite complex varied considerably from season to season. Bennett (3) and Bennett and Yaseen (1) reported several native parasites including *Trichogramma* sp., *Trichogrammatoidea* sp. (Trichogrammatidae), *Metopiops mirabilis* Townsend, *Chrysodoria* sp. (Tachinidae), *Apanteles* sp., *Bracon chontalensis* Cameron and *Hormius* sp. (Braconidae). The *Trichogramma* sp. was described as *T. bennetti* (2). The *Trichogrammatoidea* sp. is to be described by H. Nagaraja as *T. hypsipylae*. A nematode *Hexameris* sp. was also obtained from a few larvae. Mortality due to the native parasites was usually very low and did not appear to exert any appreciable level of control.

Exotic parasites

At the same time, the natural enemies of a related Old World shootborer, *H. robusta*, were being investigated by the Indian Station, CIBC and exploration had already revealed a large complex of natural enemies including 1 bethylid, 17 braconids, 9 chalcids, 1 elasmid, 1 eulophid, 1 eurytomid, 13 ichneumonids, 2 trichogrammatids, 2 tachinids, a nematode *Hexameris* sp. as parasites and 1 malachiid and a clerid as predators (3).

Owing to delays in arranging shipments from India the investigations there had almost terminated so that smaller numbers and fewer species were obtained than had been anticipated. Nevertheless, *Apanteles*, sp. (*puera* group), *Apanteles* sp. (*vitripennis* group), *Apanteles leptoura* Cam. (Braconidae), *Flavopimpla laniannulata* Cam. (Ichneumonidae) were obtained. As there was a high mortality rate in some consignments and other shipments arrived when *Hypsipyla* was scarce so that there was insufficient host material to breed and maintain stocks in the laboratory, only relatively small numbers of parasites were released.

Later, *Antrocephalus renalis* Wtston (Chalcididae), *Tetrastichus spirabilis* Wtston (Eulophidae), *Phanerotoma* sp. (Braconidae), *Trichogrammatoidea robustae* Nagaraja (Trichogrammatidae) and *Afrephialtes* sp. (Ichneumonidae) were obtained, tested in the laboratory and breeding techniques developed (4).

Releases

The programme called for releases to be made in experimental plots of mahogany and cedar set up by the Forestry Division at Brigand Hill in the east,

¹ Prepared for the Eleventh Commonwealth Forestry Conference held September 6-25, 1980, Port of Spain, Trinidad and Tobago

Cats Hill in the south and River Estate in the north. Most of the parasites received in the earlier phase were released at Brigand Hill but unfortunately the seedling trees failed to grow at this site and the plots were abandoned. The culture of *Afrephialtes* sp. was lost after three generations and before releases could be made. The other parasites were successfully mass-bred and released in the experimental plots and in stands of mahogany and cedar elsewhere. In all, 47 550 *T. spirabilis*, 6 160 *Phanerotoma* sp., 16 350

T. robustae and 2 952 *A. renalis* were released during 1969-71 (1). Details of subsequent releases are given in Tables 1-3.

Recovery surveys

Only *T. robustae* has been recovered. It was detected for the first time in 1971 and appears to be established but parasitism has remained at a low level, fluctuating between 5.3% and 8.9%.

Table 1. Releases of *Tetrastichus spirabilis* in Trinidad, 1972-76.

Locality	1972	1973	1974	1975-76
Brigand Hill	2 030	800	1 250	7 300
Marper	2 620	3 500	4 400	6 300
Toco	5 000	—	—	4 800
Curepe	—	—	—	400
Talparo	300	2 500	—	—
Biche	200	—	—	—
Cats Hill	—	1 000	—	—
St. Joseph	—	100	1 000	—
Total	10 150	7 900	6 650	18 800
Total for 1972-76	: 43 500			

Table 2. Releases of *Phanerotoma* sp. in Trinidad, 1972-76.

Locality	1972	1973	1974	1975-76
Brigand Hill	2 175	3 000	920	1 377
Marper	3 459	6 492	2 200	3 227
Toco	3 921	—	—	3 000
Talparo	1 000	800	—	—
Biche	700	—	—	—
Cats Hill	—	420	—	—
St. Joseph	—	900	100	—
Arena	—	—	200	400
Total	11 255	11 612	3 420	8 004
Total for 1972-76	: 34 291			

Table 3. Releases of *Trichogrammatoidea robustae* in Trinidad 1972-76.

Locality	1972	1973	1974	1975-76
Brigand Hill	800	1 400	1 050	950
Marper	1 650	1 000	2 100	2 700
Toco	4 520	—	—	4 200
Talparo	400	100	—	—
Biche	100	—	—	—
Cats Hill	—	200	—	—
St. Joseph	—	100	—	—
Arena	—	—	200	—
Carepe	—	—	100	—
Total	7 470	2 800	3 450	7 850
Total for 1972-76	: 21 570			

Discussion

Although *Antrocephalus renalis*, *Tetrastichus spirabilis* and *Phanerotoma* sp were released in sufficient numbers over several years to offer a reasonable chance of establishment they have apparently failed to adapt to Trinidad conditions despite the fact that they readily attack *H. grandella* and *H. ferrealis* in the laboratory. *T. robustae*, although established, does not seem to be capable of controlling the pest. These parasites were available mainly because they could be easily bred and multiplied in large numbers and because they are important parasites of *H. robusta* in India. The delayed start of the project, beyond the control of CIBC, did not permit it to be synchronized with investigations at the Indian Station which would have allowed adequate shipments of several other parasites, some of which, although not so readily bred in the laboratory, might have proved more successful.

As efforts to grow mahogany and cedar on a plantation scale in Trinidad are to continue, the Ministry of Agriculture has recently provided additional funds to allow the establishment of a temporary station in the forest areas of India so that stocks of other parasites can be obtained. It is hoped that some of these will be established and exert effective control.

Acknowledgements

These investigations were financed by the Forestry Division, Ministry of Agriculture, Trinidad and Tobago. Dr. F. D. Bennett, Director, CIBC has given advice and help throughout the investigation.

Summary

Hypsipyla spp. have so far foiled the attempts of the Forestry Department to establish mahogany and Spanish cedar as plantation crops in Trinidad. To attempt to control these pests the West Indian Station, Commonwealth Institute of Biological Control, procured stocks of several parasites – *Apanteles* spp., *Phanerotoma* sp., *Tetrastichus spirabilis*, *Antrocephalus renalis*, *Flavopimpla laniannulata*, *Afrephialtes* sp and *Trichogrammatoidea robustae* – from India. Some of them were released directly into the field and stocks of others have been maintained for periodic releases. Adequate number of *A. renalis*, *T. spirabilis*, *Phanerotoma* sp and *T. robustae*, to afford a reasonable chance of establishment, have been released over several years. *T. robustae*

is now established widely but other parasites have failed to adapt to Trinidad conditions. Recommendations for an extended biological control campaign have recently been approved and additional funds have been provided by the Ministry of Agriculture in order to obtain stocks of other parasites of *H. robusta* from India for laboratory evaluation and possible field releases.

November 22, 1982

M YASEEN*

* Commonwealth Institute of Biological Control Trinidad, West Indies.

Literature cited

- 1 BENNETT, F. D and YASEEN, M Parasite introductions for the biological control of three insect pests in the Lesser Antilles and British Honduras. PANS 18:468-474 1972
- 2 NAGARAJA, H and NAGARKATTI, S A key to some new world species of *Trichogramma* (Hym.: Trichogrammatidae) with descriptions of four new species. Proceedings of the Entomological Society of Washington 75:288-297 1973
- 3 RAO, V. P and BENNETT, F. D. Possibilities of biological control of the meliaceous shoot-borers *Hypsipyla* spp. (Lepidoptera: Phycitidae) Commonwealth Institute of Biological Control Technical Bulletin 12:61-81 1969.
- 4 YASEEN, M. and BENNETT, F. D Studies on the shoot-borer *Hypsipyla grandella* (Zeller) (Lepidoptera: Phycitidae) XIII. Methods for breeding parasites for release against *Hypsipyla* spp in Latin America. Turrialba 22:463-467 1972.

Notas preliminares sobre el barrenador de los brotes terminales del pino, *Rhyacionia frustrana* (Lepidoptera; Tortricidae) en Costa Rica.

Summary. Young plantations of pine species, *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, *P. oocarpa*, *P. elliottii*, *P. canariensis*, *P. kesiya* and *P. radiata*, have been found severely attacked by the tortricid, *Rhyacionia frustrana* Comstock in Turrialba, Costa Rica. Height mortality of larvae has been found after applications of Dimethoate (1 cc/L perfection 40% LE). Natural biological control also has been observed both in larvae and pupae. Some recommendations on pine plantation management under tropical conditions, are given.

En los bosques de coníferas de Europa y América del Norte, los lepidópteros, *Rhyacionia bouliana* (Denis & Schiffermueller) y *Rhyacionia frustrana* Comstock, (Tortricidae, Oleothreutinae), son conocidos como las plagas más comunes en plantaciones naturales, artificiales y huertos semilleros en la mayoría de las especies de pino (*Pinus resinosa* Ait., *P. taeda* L., *P. mugo* Turra, *P. silvestris* L., *P. ponderosa* L., etc.) (1, 4, 5, 8)

La especie *R. frustrana* es más común en el sur-este de los Estados Unidos, México y América Central (7). No obstante, en América Central no se ha encontrado causando problemas de importancia económica. (Informe de viaje de estudios e investigación a los países centroamericanos, 1971–1972, de los estudiantes del Departamento de Ciencias Forestales Tropicales Turrialba, Costa Rica, IICA, 1972. En las zonas templadas el insecto pasa el invierno en estado de pupa dentro de los meristemas, el adulto emerge y se aparea en los primeros días cálidos de primavera. Durante esta estación los huevos tardan hasta 30 días para emerger, mientras que en verano tardan de 5 a 10 días (4, 8)

En las zonas tropicales se tiene muy poca información sobre la biología de este insecto, así como de la magnitud del daño que causa a los pinos; y la respuesta de estos al ataque. El presente es un informe basado en observaciones preliminares sobre el ataque de *R. frustrana* en plantaciones jóvenes de varias especies de pinos tropicales en Turrialba, Costa Rica.

Características del ataque

El ataque se localiza tanto en los brotes nuevos de las ramas, como en el brote del eje principal. La característica inicial del ataque es la presencia de pequeños acúmulos de resina poco visibles de color blanquecino en las terminales. Al aumentar la larva su actividad, la cantidad de resina aumenta y en muchas ocasiones da la apariencia de una pequeña burbuja blanquecina. En el tercer y cuarto estadio de la larva, ésta se localiza

en el interior del meristemo y pierde movilidad. En este momento, el brote se recubre por una capa gruesa de resina de superficie irregular, y las agujas empiezan a tornarse amarillentas. Cuando el insecto alcanza el estado de pupa, el meristemo toma un color café fácilmente distinguible a distancia.

Como resultado de la destrucción de las terminales, de 2 a 6 nuevos rebrotes aparecen rápidamente, lo que da a la copa un aspecto más denso. Los nuevos crecimientos que posteriormente salen del brote principal no presentan deformaciones. No obstante, en muy poco caso se observa dominancia apical; dando como resultado la bifurcación del eje principal.

Wolda (6) indica que el aumento de las poblaciones está sincronizado con la disponibilidad de alimento. Bajo las condiciones climáticas de Turrialba, el *P. caribaea* var. *hondurensis* Barr. and Golf. presenta crecimientos nuevos casi todo el año; favoreciendo de esta manera que la reproducción del insecto sea casi constante durante el año, fenómeno muy común en los insectos que habitan en el trópico y que es conocido como 'multivoltinismo'.

Es importante hacer notar que en Costa Rica no existen bosques naturales de pinos. Además, entre los bosques naturales de pino de Nicaragua y las plantaciones de Costa Rica existe una faja aproximada de 250 km, en su mayoría cubierta por bosques de hoja ancha, que podría considerarse como una barrera natural para la migración del insecto hacia el sur. Sin embargo, en Costa Rica el insecto ya se ha informado como plaga desde 1982, (Comunicación personal Loren Ford, Instituto Tecnológico de Costa Rica, 1982), principalmente en la región de Turrialba, donde existe la mayor concentración de bosques artificiales de pino.

Por muchos años en Costa Rica se han venido introduciendo varias especies de pinos, principalmente a nivel de jardines y parques; y no es sino hasta en los últimos 5 ó 6 años que las plantaciones de pino han empezado a proliferar. Es precisamente en este momento cuando aparece la plaga. Posiblemente ésta fue traída hace ya muchos años como resultado de la introducción de material vegetativo, pero por el poco número de árboles y lo disperso de éstos, la presencia del insecto pasa inadvertida.

Las observaciones preliminares en las plantaciones de la Empresa Celulosa de Turrialba, S.A., localizadas en Turrialba, Costa Rica bosque muy húmedo tropical premontano de acuerdo con (Tosi, J. Mapa ecológico de Costa Rica según zonas de vida de Holdrige. Escala: 1:170 000. 1969), indican que tanto las plantaciones comerciales de

P. caribaea var. *hondurensis* como las parcelas experimentales de *P. oocarpa* Shiede, *P. elliottii* E., *P. canariensis* C. Smith, *P. kesiya* R. y G. y *P. radiata* D. Don, resultan igualmente atacadas.

En las plantaciones menores de 2 años de *P. caribaea* var. *hondurensis* en Celulosa de Turrialba, se ha observado que árboles con 1.5 m de altura y 15 ramas promedio el 26% de las ramas están atacadas. Además se ha encontrado que en algunas áreas el 91% de los árboles están atacados.

Se ha podido observar que la intensidad del ataque varía dentro de una misma área; es posible que esta característica esté relacionada con el grado de vigor de la plantación. Así, en áreas que presentan un crecimiento más vigoroso, el número de árboles y ramas por árboles afectados es menor.

El insecto afecta indistintamente la terminal principal como las laterales. El ataque a la terminal principal provoca la inmediata aparición de rebrotes (hasta 6), los cuales presentan un crecimiento vertical sin deformaciones. No obstante, en muy pocas ocasiones se observa dominancia apical, lo que ocasiona la bifurcación del árbol. Esta bifurcación se repite si el rebrote es atacado nuevamente.

Pruebas preliminares de control en las plantaciones de 1.5 años de edad en Celulosa de Turrialba, indican que 8 días después de la aplicación se ha alcanzado hasta 80% de mortalidad con aplicaciones de Dimethoate (1 cc/L. Perfeckthion 40% LE), 48% con Diazinón (1 cc/L. 60% LE); y 40% con carbofuran (10 g/árbol de furadán 5 G).

Muestreos periódicos después de la aplicación, indican que bajo las condiciones de precipitación de la zona (2 500 mm/año) el Dimethoate tiene un efecto más prolongado.

Los porcentajes de mortalidad obtenidos están directamente relacionados con el estado de desarrollo de la larva al momento de la aplicación del químico. Para lograr mayor control, la aplicación debe realizarse en el momento que exista un mayor porcentaje de larvas en los estadios 1 y 2; de lo contrario la efectividad del químico será mínima. Aparentemente muestreos semanales pueden ser adecuados para detectar el momento preciso para la aplicación.

El bosque de pino con 1 600 árboles por hectárea y en condiciones de topografía accidentada, se emplearon aproximadamente 1.54 jornales/ha (se entiende por jornal: 8 horas de trabajo/día) por aplicación con bomba de espalda. El costo de mano de obra es relativamente bajo, lo que permitirá realizar aplicaciones periódicas más seguidas para dar mayor

protección a la plantación en la etapa más crítica de desarrollo.

En zonas húmedas como en el caso de Celulosa de Turrialba, el crecimiento inicial del árbol se ve afectado tanto por el insecto como por el exuberante crecimiento de malezas. Si los dos factores no son controlados a tiempo, la plantación puede desaparecer rápidamente. Es posible que este no sea el caso en las zonas secas, donde el efecto de competencia de las malezas es menor.

Es posible que el efecto de insecticidas sistémicos de absorción radical como el Carbofuran se ve severamente reducido por la alta precipitación y por la competencia con las malezas. Razón por la que los resultados citados anteriormente no son comparativos con pruebas realizadas en otros países (1, 2, 3).

Muestreos realizados en áreas que no están bajo control químico, han mostrado un control biológico natural de hasta 15% en las larvas, las que en la mayoría de los casos aparecen tapizadas de un micelio grisáceo y a veces parcialmente cubiertos por huevecillos. También se ha observado mortalidad en las pupas.

Conclusiones y recomendaciones

Por tratarse de un problema reciente, no es posible decir hasta qué punto la plantación puede verse económicamente afectada. No obstante por las observaciones realizadas hasta el momento en los bosques jóvenes (1-2 años) de Celulosa de Turrialba, es posible decir que si no se implementa algún tipo de control para reducir la población de insectos, el crecimiento y forma de los árboles se verán severamente afectados.

Bajo estas condiciones, puede ser económicamente muy riesgoso, establecer plantaciones comerciales de pino en zonas ecológicamente no aptas, sin prever operaciones de control. Es recomendable que los viveros produzcan plántulas totalmente libres de ataque, para garantizar un desarrollo inicial rápido; y tan pronto como aparezcan los primeros ataques en la plantación, estos pueden controlarse mecánicamente, para evitar que la población de insectos aumente; principalmente durante el período en el cual la altura de los árboles es menor de 3.0 m. Muestreos realizados en plantaciones de 1 a 4 años indican que solamente de 5 a 10% de las terminales principales son atacadas, cuando la altura del árbol es superior de 3.0 m.

Resumen

Las plantaciones jóvenes de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, *P. oocarpa*, *P. elliottii*, *P. canariensis*, *P.*

kesiya and *P. radiata* en Turrialba, Costa Rica, son severamente atacadas por el barrenador del brote terminal *Rhyacionia frustrana* Comstock. Se encontró una elevada mortalidad de larvas al aplicar Dime-thoate (1 cc/L perfection 40% LE). Asimismo, se observó un control biológico natural sobre las larvas y las pupas. Se incluye algunas recomendaciones sobre el manejo de plantaciones de pino bajo condiciones tropicales.

10 de diciembre de 1982

R. SALAZAR*

* Celulosa de Turrialba S.A., Turrialba, Costa Rica

Literatura citada

- 1 GARGLULLO, P. M. y BERISFORD, C. W. Sampling for pine tip-moths. A procedural guide. Research Bulletin No. 272. Experimental State University of Georgia 1981. 23 p.
- 2 MILLER, W. E.; WANBACH, R. F. y ANFANG, R. A. Effect of past european pine shoot moth infestation on volume yield of pole-sized red pine. *Forest Science* 24(4):543-550. 1978.
- 3 PREE, D. J. and SAUNDERS, J. L. Bioactivity and translocation of carbofuran residues in mugo pine. *Environmental Entomology* 2(2): 262-267. 1973.
- 4 PREE, D. J. Chemical control of the european pine shoot moth. *Journal of Economic Entomology* 65(4):1 081-1 085. 1972.
- 5 THOMPSON, H. E.; ALLAN, G. G. and NEOGI, A. N. The control of pine tip moths by using sustained release systematic insecticides. *International pest control* 1981.
- 6 WOLDA, H. Seasonal fluctuations in rainfall, food and abundance of tropical insects. *Journal of Animal Ecology* 43:369-381. 1978.
- 7 YATES, H. O.; OVERGAARD, N. A. and KOERBER, T. W. Nantucket pine tip moth. *Forest Insect & Disease Leaflet* 70. Forest Service USA 1981. 7 p.
- 8 YATES, H. O. Larval migration of *Rhyacionia* spp. on pine shoots (Lepidoptera: Olethreutidae). *Journal of Georgia Entomology Society* 2(2): 37-41. 1967.

Efectos del ácido succínico 2,2 - dimetil hidrazida (daminozida) en los niveles de hormonas endógenas en semillas inmaduras y en la iniciación floral en manzano.

Summary. Spraying apple trees (cv. Cox's Orange Pippin) with 2 000 ppm daminozide 2 weeks after full bloom increased return bloom the following year. Analyses of extracts of seeds removed from fruits at different times after spraying with the retardant did not show any significant change in gibberellin and abscisic acid content. However, there was a decrease in auxin levels 24 and 36 days after flowering and an increase in cytokinin levels in seeds after 18 and 30 days.

Existe evidencia de que las hormonas endógenas tienen una función importante en la formación de yemas florales en las especies frutales (13, 21, 24). Se ha postulado que las giberelinas sintetizadas en semillas en desarrollo en frutos de manzano probablemente son factores que inhiben la iniciación floral (9).

Los retardantes químicos de crecimiento han sido utilizados durante varios años para el control de floración en frutales caducifolios (1, 21, 24), como por ejemplo el compuesto orgánico daminozida (Alar) en cultivares de manzano (15). El modo de acción de esta sustancia en el manzano no se conoce con exactitud; sin embargo, se ha sugerido que el daminozida actúa originando cambios en el sistema hormonal de los tejidos del frutal (8, 24). Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue examinar los efectos que este retardante de crecimiento causa en los niveles de hormonas en semillas de frutos en desarrollo. El número de flores formadas fue evaluado para confirmar uno de los efectos característicos del mencionado producto químico.

Materiales y métodos

Este trabajo se realizó en la estación experimental de Long Ashton, Inglaterra, en el periodo de 1977 - 1979. El cultivar utilizado fue Cox's Orange Pippin injertado sobre MM 106. Los tratamientos con daminozida en ambos años fueron efectuados 2 semanas después de floración en una concentración de 2 000 ppm.

Para el estudio de giberelinas y ácido abscísico, en 1977, 72 árboles en una plantación (cuatro hileras) de 13 años fueron divididos en 2 grupos y subdivididos en 3 bloques cada uno con 12 árboles por bloque. Un grupo fue asperjado con el retardante, el otro (testigo) con agua. En 1978, dos hileras de árboles de la misma plantación fueron empleadas para estudiar auxinas y citocininas, dividiendo cada una en 2 grupos (15 árboles por grupo), asperjando uno de ellos con daminozida y el otro con agua a la misma concentración.

Durante el período comprendido entre un día después del tratamiento y la época de cosecha, semillas de 100 frutos de cada bloque o grupo fueron extraídas en cada muestreo. Las hormonas en estudio fueron extraídas de cada muestra una vez que esta fue liofilizada, triturada y mezclada con metanol al 80% y 100% durante un período de 24 horas a una temperatura de -18°C (16).

La purificación de cada muestra previa al análisis biológico o analítico se efectuó de la siguiente manera:

Giberelinas y ácido abscísico

Las muestras en fase acuosa fueron alcalinizadas con solución buffer (pH 8.0) y lavadas con éter de petróleo y acetato de etileno (X2). Posteriormente combinadas con PVP y filtradas en papel Whatman No. 1. En seguida el pH fue ajustado a 2.5 con ácido clorhídrico y las hormonas obtenidas en la fase etílica del acetato de etileno agregado (X3) después de acidificar la fase acuosa. Cada muestra fue posteriormente pasada por cromatografía de capa fina utilizando Kieselgel Gf254 como sílica e isopropanol; amoniaco; agua (10:i:i v/v) como solvente

Auxinas

La solución conteniendo auxinas fue ajustada a pH de 8.0 con hidróxido de sodio y filtrada en papel Whatman No. 1. En seguida el filtrado fue acidificado a pH de 2.5 con ácido clorhídrico y combinado con cloroformo (X3), quedando las auxinas en la fase de cloroformo. Posteriormente, cada muestra fue cromatografiada en la forma antes descrita

Citocininas

Cada muestra fue combinada con 50% de etanol y pasada a través de una columna de resina de intercambio catiónico (Dowex 50W - X8 200-400). Obteniendo las citocininas al agregar a la columna solución de amoníaco 1N (50 ml) y 3N (250 ml). En seguida cada muestra fue cromatografiada usando papel cromatográfico Whatman No. 3 y el mismo tipo de solvente utilizado para las hormonas ya descritas.

El contenido de giberelinas fue determinado usando las pruebas biológicas del *Rumex* (23) y del hipocotilo de la lechuga (4), utilizando diez repeticiones de cada muestra por bioensayo.

Los niveles de auxinas y citocininas se obtuvieron utilizando respectivamente los ensayos biológicos del coleoptilo del trigo (siete repeticiones por muestra en cada bioensayo) y del *Amaranthus* (diez repeticiones

de cada muestra por bioensayo) según lo indican Bentley y Housley (2) y Challice (3). El contenido del ácido abscísico fue determinado utilizando tres repeticiones por muestra mediante el uso de una cromatografía líquida de gases equipada con un detector para la captura del electrón ^{63}N (7).

Para la evaluación del efecto del daminozida en la promoción de iniciación floral, se hicieron conteos de flores durante la primavera posterior a la fecha de los tratamientos en 4 ramas de c/u de los árboles experimentales previamente seleccionados

Resultados

Los resultados que se presentan en el Cuadro 1 muestran que el número de flores formadas fue significativamente mayor en ambos años de experimentación en los árboles que recibieron la aplicación del daminozida. Se podrá observar en las Figuras 1 y 2, que el nivel y fluctuación de giberelinas y ácido abscísico fueron muy semejantes en el testigo y en los tratados con el retardante y que no hubo diferencia significativa

El contenido de auxinas en las semillas de los frutos tomados de árboles tratados con el retardante disminuyó significativamente en las muestras tomadas 9 y 21 días después del tratamiento (Figura 3). La figura también muestra en ambos grupos que la actividad biológica fue mayor conforme la semilla fue avanzando en su desarrollo fisiológico. El tratamiento con daminozida indujo aumentos significativos en el contenido de citocininas en las semillas a los 3 y 15 días después de la aspersión (Figura 4). La máxima actividad biológica de estas hormonas en las semillas se observó un día después del tratamiento, mientras que la mínima se obtuvo 70 días después

Discusión

El incremento en el número de flores formadas en los árboles asperjados con daminozida apoyan los reportes de otros investigadores (1, 13, 24) y por lo tanto se confirma que el compuesto químico penetró en los tejidos del frutal causando cambios fisiológicos en él.

Los resultados de los diferentes grupos de hormonas en las semillas de los testigos (Figuras 1-4) indican claramente que durante su desarrollo, estos órganos contienen varias de estas sustancias. Luckwill (11, 12) ha postulado que la aparición y desaparición de hormonas específicas en la semilla, están ligadas con cambios sucesivos en el desarrollo del embrión y endospermo de ésta. Así, la primera fase se caracteri-

Cuadro 1. Efecto del tratamiento con daminozida (2 000 ppm) en la floración (número de flores formadas) del cv. Cox's Orange Pippin. El daminozida se aplicó dos semanas después de la floración en 1977 - y en 1978.

Año de evaluación	Número de flores por árbol ^a	
	Testigo	Daminozida
1978	409 ± 12.8	730 ± 11.8**
1979	303 ± 43.5	837 ± 10.2**

a Cada valor representa el promedio de flores en cuatro ramas/árbol

** El valor es superior al testigo con $P < 0.01$ de error

za por el desarrollo del endospermo libre de núcleo con poco crecimiento del embrión, misma que ocurre en algunos cultivares entre 1 a 4 semanas después de floración y está asociada con la presencia de citocininas (Figura 4) Posteriormente es iniciado el desarrollo del endospermo celular primario conjuntamente con la aparición de auxinas (Figura 3). La segunda fase del desarrollo es asociada con el crecimiento rápido del embrión, con la digestión nuclear y del endospermo primario y con la formación del endospermo secundario. Los resultados en la Figura 1, confirman la presencia de giberelinas durante esa fase fisiológica

Las fluctuaciones del AAB observadas en el presente trabajo son similares a las reportadas por Gil *et al.* en semillas de pera (5) Los resultados en la Figura 2 sugieren la metabolización de este después del máximo incremento ocurrido 17 semanas posteriores a la floración (20) La baja tan drástica en los niveles de esta hormona observada en la última fecha de muestreo, coincide con los resultados obtenidos por varios autores (16, 20, 26) Con base en los efectos que daminozida produjo en los niveles de hormonas en la semilla y su relación con el proceso de la iniciación de yemas florales, los siguientes puntos son de consideración: Se sabe que las giberelinas son inhibidores del proceso de iniciación floral en manzano (13, 14) y que el daminozida además de estimular la formación de yemas florales reduce los niveles de esas hormonas en ápices de este frutal (8). Sin embargo, en el presente trabajo, aunque se observó un aumento en la formación de flores con el tratamiento del retardante, no hubo cambios significativos en el contenido de esas hormonas Considerando que en este estudio se estimó cuantitativamente el contenido de giberelinas y que en la actualidad se conocen 56 de ellas (G. V. Hoad, comunicación personal), es probable que de las 13 encontradas en semillas de manzano (9, 16) solamente una o varias sean afectadas por el daminozida

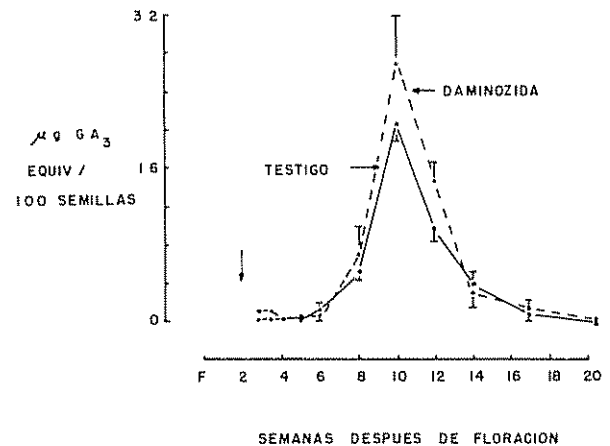


Fig. 1. Niveles de giberelinas en semillas en desarrollo del cv. Cox' Orange Pippin obtenidas de árboles tratados con daminozida (2 000 ppm) o con agua (testigo) dos semanas después de floración. La época de floración (F) y del tratamiento (1) son indicadas. Cada punto representa el promedio de 3 repeticiones. Las diferencias no fueron significativas con un $P < 0.05$ de error

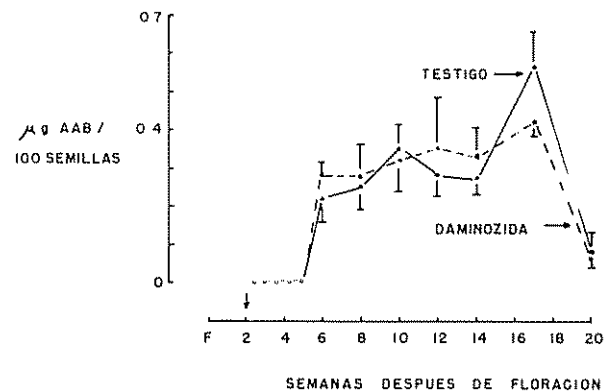


Fig. 2. Niveles de ácido abscísico en semillas en desarrollo del cv. Cox's Orange Pippin obtenidas de árboles tratados con daminozida (2 000 ppm) o con agua (testigo) dos semanas después de floración. Para otros detalles véase la Figura 1.

La disminución en los niveles de auxinas en las muestras tratadas con el daminozida (Figura 3) confirma lo dicho por Jindal y Dalbro (10) quienes observaron menor contenido de esas hormonas en las ramas de manzano después de que los árboles fueron tratados con el retardante de crecimiento.

También Werzilov *et al.* (22) encontraron bajos niveles de auxinas en las yemas de manzano durante la época de su transformación en yemas florales.

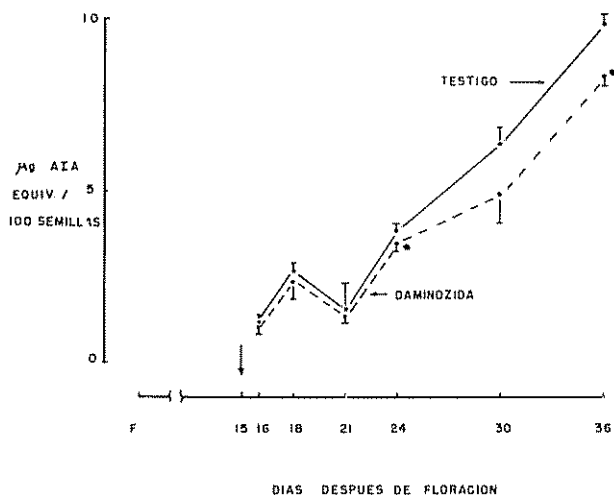


Fig. 3. Niveles de auxinas en semillas en desarrollo del cv. Cox's Orange Pippin obtenidas de árboles tratados con daminozida (2 000 ppm) o con agua (testigo) dos semanas después de floración. Cada punto representa el promedio de 2 repeticiones. Las diferencias significativas al $P < 0.05$ (*) son indicadas. Para otros detalles véase la Figura 1

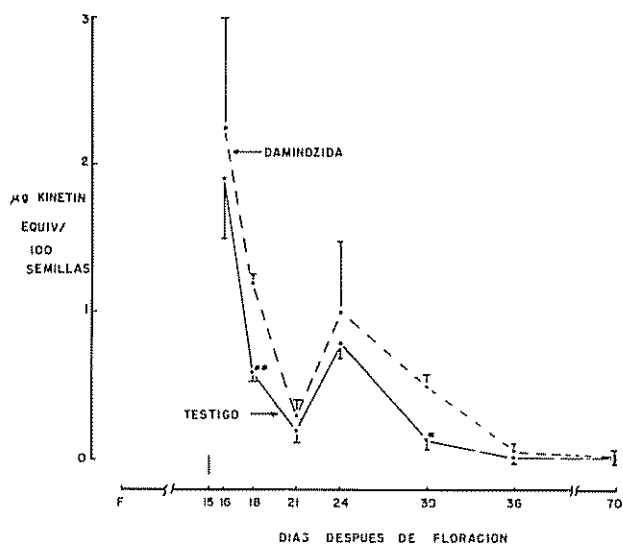


Fig. 4. Niveles de citocininas en semillas en desarrollo del cv. Cox' Orange Pippin obtenidas de árboles tratados con daminozida (2 000 ppm) o con agua (testigo) dos semanas después de floración. Cada punto representa el promedio de 2 repeticiones. Las diferencias significativas al $P < 0.05$ (*) o al $P < 0.01$ (**) son indicadas. Para otros detalles véase la Figura 1

Sobre esta base, es probable que la biosíntesis de las auxinas en las semillas sea bloqueada por el daminozida como lo han demostrado anteriormente Williams y Stahly (25). Por otro lado, los bajos niveles de auxi-

nas en las semillas de las plantas tratadas, se consideran suficientes para satisfacer la demanda ocasionada por el desarrollo de éstas. El tratamiento de daminozida no causó efectos significativos en los niveles del ácido absísico en las semillas (Figura 2). Aunque la función de éste en el proceso de floración en frutales no se ha aclarado (24), esta hormona se ha relacionado ampliamente en la literatura con los efectos causados por sequía temporal ("Water stress"). El efecto clásico es que esta condición causa un aumento en los niveles de ácido absísico en los tejidos de plantas (26). Sin embargo, la sequía temporal induce efectos inconsistentes en la floración de frutales ya que en algunos aumenta la formación de yemas florales (13) y en otros las disminuye (17). Por lo tanto no se puede establecer una conclusión sobre la función de esta hormona en el proceso de la iniciación floral.

El efecto causado por el daminozida en las citocininas en semillas de manzano u otros frutales, no ha sido discutido ampliamente por otros autores (16), por lo tanto el aumento en los niveles de estas hormonas causado aparentemente por el retardante (Figura 4) permite ampliar los conocimientos sobre los efectos de este producto en semillas de manzano. Se ha sugerido que las citocininas en su mayoría son sintetizadas en las raíces y transportadas por los vasos leñosos a las partes aéreas del frutal (18). Sin embargo, los experimentos de Ramírez (16) mostraron que los niveles de citocininas en esos tejidos son muy bajos después de la época de floración y no sufren cambio alguno con el tratamiento del retardante. Esto permite sugerir que las citocininas localizadas en las semillas del fruto (Figura 4) posiblemente fueron sintetizadas *in situ*. El significado de éstas en el proceso de iniciación floral en el manzano no está bien documentado, en cambio, en otras especies frutales se ha considerado de vital importancia en la formación de yemas florales. Por ejemplo Srinivasan y Mullins (19) demostraron en *Vitis* sp la transformación de sarmientos en inflorescencias cuando el ápice de éstos fue tratado con citocininas. Por otro lado Grochowska y Karaszewska (6) encontraron un alto nivel de citocininas en ramas de manzano las cuales formaron un mayor número de frutos.

En el presente trabajo no se observó cambio significativo en giberelinas o ácido absísico en semillas de frutos cuyos árboles fueron tratados con daminozida. Lo contrario ocurrió con auxinas y citocininas las cuales respectivamente sufrieron una reducción y un aumento. La relevancia de estos resultados con el proceso de iniciación floral en manzano requiere de mayor investigación.

Resumen

La aspersión con daminozida (2 000 ppm) a árboles de manzano del cv. Cox' Orange Pippin 2 semanas

después de floración, originó un aumento en yemas florales en el siguiente año

Análisis de extractos de semillas tomadas de frutos a diferentes fechas posteriores al tratamiento con daminozida no mostraron cambio alguno en los niveles de giberelinas o ácido abscísico al compararse con los testigos. Sin embargo, se observó una reducción en el contenido de auxinas a los 24 y 36 días después de floración, mientras que el nivel de citocininas aumentó a los 18 y 30 días después de esa fecha.

24 de setiembre de 1982

H. RAMIREZ*
G. V. HOAD**

* Departamento de Horticultura Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro", Saltillo, Coahuila, México

** Long Ashton Research Station University of Bristol Bristol BS18 9AF Inglaterra

Literatura citada

1. BATJER, L. P., WILLIAMS, M. W. y MARTIN, G. C. Effects of N-dimethyl amino succinamic acid (B-nine) on vegetative and fruit characteristics of apples, pears and sweet cherries. *Proceeding of the American Society of Horticultural Sciences* 85:11-16. 1964
2. BENTLEY, J. A. y HOUSLEY, S. Bioassay of plant hormones. *Physiologia Plantarum* 8:405-409. 1954
3. CHALLICE, J. S. Inhibition by phenolic compounds of cytokinin stimulated betacyanin synthesis in *Amaranthus caudatus*. *Biologia Plantarum (Praga)* 19(3):212-218. 1977.
4. FRANKLAND, B. y WAREING, P. F. Effect of gibberellic acid on hypocotyl growth of lettuce seedling. *Nature London* 185:255-256. 1960.
5. GIL, G. F., MARTIN, G. C. y GRIGGS, W. H. Fruit set and development in the pear: Extractable endogenous hormones in parthenocarpic and seeded fruits. *Journal of the American Society of Horticultural Sciences* 97:731-735. 1972.
6. GROCHOWSKA, M. J. y KARASZEWSKA, A. A possible role of hormones in growth and development of apple trees and a suggestion on how to modify their action. *Acta Horticulturae* 80:457-464. 1978.
7. HOAD, G. V. Effect of moisture stress on abscisic acid levels in *Ricinus communis* L. with particular reference to phloem exudate. *Planta (Berlin)* 113:367-372. 1973.
8. HOAD, G. V. y MONSELISE, S. P. Effects of succinic acid 2,2-dimethyl hydrazide (SADH) on the gibberellin and abscisic acid levels in stem tips of M 26 apple root stocks. *Scientia Horticulturae* 4:41-47. 1976.
9. HOAD, G. V. y RAMIREZ, H. La función de las giberelinas sintetizadas en las semillas del fruto para el control de floración en manzano Turrialba 30(3):284-288. 1980
10. JINDAL, K. K. y DALBRO, S. Effect of succinic acid 2,2-dimethylhydrazide on endogenous auxin level in apple shoots. *Physiologia Plantarum* 39:119-122. 1977
11. LUCKWILL, L. C. Studies on fruit development in relation to plant hormones. I: Hormone production by the developing apple seed in relation to fruit drop. *Journal of Horticultural Sciences* 28:14-24. 1953
12. LUCKWILL, L. C. Hormonal aspects of fruit development in higher plants. *Symposium of the Society of Experimental Biology* XI: 63-85. 1957
13. LUCKWILL, L. C. The control of growth and fruitfulness of apple trees. *In: Physiology of Tree Crops* L. C. Luckwill y C. V. Cutting eds. Academic Press, 1970 pp. 237-254
14. LUCKWILL, L. C. Growth regulators in flowering and fruit development. *Pesticide Chemistry in the 20th century* No. 37 of the American Chemistry Society Symposium series, 1977. pp. 293-304
15. LUCKWILL, L. C. y CHILD, R. D. The meadow orchard: A new concept of apple production based on growth regulators. *Acta Horticulturae* 30(1):213-300. 1973.
16. RAMIREZ, H. Effects of growth substances on some physiological processes in apple in relation to flower initiation. Ph.D. Thesis. University of Bristol. England. 1979. p. 191.

- 17 RAMIREZ, H y URIU, K. Efecto de sequía en diferentes épocas en chabacano (*Prunus armeniaca* L.) Publicación Técnica No 1 Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro" 1976 p 30
- 18 SKENE, K. G. M. Increases in the levels of cytokinins in bleeding sap of *Vitis vinifera* L. after CCC treatment Science 159:1 477-1 478. 1968.
- 19 SRINIVASAN, C. y MULLINS, M. G. Flowering in *Vitis*. Conversion of tendrils into inflorescences on bunches of grapes Planta 145: 187-192 1979
- 20 TINELLY, E. T., SONDHEIMER, E., WALTON, D. C., GASKIN, P. y MAC MILLAN, J. Metabolites of 2-¹⁴C-*abscisic acid* Tetrahedron Letters 2:139-140 1973.
- 21 TROMP, J. The interaction of growth regulators and three orientation on fruit-bud formation in apple. Acta Horticulturae 34:185-188 1973.
- 22 WERZILOV, W. F., PLOTNIKOVA, I. V. y ALEXANDROVA, W. S. Growth regulators in relation to apple bud differentiation Acta Horticulturae 80:175 1978
23. WHYTE, P. y LUCKWILL, L. C. A sensitive bioassay for gibberellins based on retardation of leaf senescence in *Rumex obtusifolius* (L). Nature London 210:1 360. 1966
- 24 WILLIAMS, M. W. Chemical control of vegetative growth and flowering in apple trees Acta Horticulturae 34:167-173 1973
- 25 WILLIAMS, M. W. y STAHLY, E. A. Effect of cytokinins on apple shoot development from axillary bud. Journal of Horticultural Sciences 40:31-41. 1968
- 26 WRIGHT, S. T. C. Phytohormones and strees phenomena. In: Phytohormones and Related Compounds. A Comprehensive Treatise, III D. S. Letham, P. B. Goodwin y T. J. V. Higgins eds. Elsevier/North Holland Biomedical Press. 1978 pp 495-536.

Interacciones entre el Acido Succínico 2,2 – Dimetil Hidrazida (Daminozida) y otras Hormonas en la Iniciación Floral del Manzano.

Summary. Spur defolating, defruiting and daminozide sprays have been carried out in combinations with injections of different hormones to spurs of the apple cultivar Egremont Russett and their effects on flower bud formation determined. Gibberellin application tended to inhibit flower initiation but cytokinins, particularly zeatin, strongly promoted flower initiation when applied alone or in combination with daminozide. The results are discussed in terms of the role of hormones on flower initiation in apple

Se ha demostrado que en manzano la capacidad de un dardo para formar yemas florales es disminuida cuando se eliminan las hojas en el formadas (1) Este efecto es menor si la eliminación de hojas en el dardo se efectúa a partir de 6 semanas posteriores a la floración completa (8) Aunque existe esta evidencia, la función que tienen las hojas en el proceso de iniciación floral no ha sido aclarado suficientemente (1) Una hipótesis sobre la acción de estos órganos ha sido postulada por Jackson y Sweet (7), quienes han sugerido que estas actúan como productoras de alimento necesario para la formación de flores. Sin embargo, se ha observado en experimentos con ¹⁴CO₂, que aquellos dardos que carecen de hojas, contienen suficientes carbohidratos, los cuales se presume son transportados desde las hojas de dardos localizados en otros puntos distantes en la misma rama (9)

Por lo tanto, otras alternativas quizá más aceptables serían que las hojas en el dardo podrían sintetizar una o más hormonas necesarias para la iniciación del proceso floral o bien que su función sea la de redistribuir en la yema meristemática del dardo aquellas hormonas responsables de la iniciación floral, si acaso fueran sintetizadas en otras partes del árbol (11)

Se ha notado también la inhibición de la iniciación floral en dardos de manzano cuando existe la presencia de frutos con semillas (5) Estos resultados fueron discutidos en términos de hormonas endógenas, las cuales se piensa son producidas en las semillas en desarrollo (10, 12) Por lo tanto, en este trabajo se investigó la posible función de diferentes hormonas en el proceso de iniciación floral en manzano.

Materiales y métodos

El presente trabajo se llevó a cabo en la Estación Experimental de Long Ashton, en Bristol, Inglaterra. Setenta y dos árboles de siete años de edad del cv Egremont Russet/MM 106 plantados en recipientes con arena (30 cm de diámetro x 25 cm de altura) fueron distribuidos en un diseño factorial (2x2x2x6x3), utilizando un árbol como unidad experimental. Los árboles fueron divididos en dos grupos. Uno fue

asperjado con daminozida a razón de 2 000 ppm y el otro con agua, el 16 de abril de 1977. Esta fecha correspondió a la etapa de floración plena en los árboles. Posteriormente, y una vez seleccionados y marcados 20 dardos en cada árbol, cada grupo se subdividió en dos. De estos subgrupos se tomaron doce árboles testigo e igual número de tratados con daminozida en cada una de las siguientes fechas: 9 de junio, 3 de julio y 29 de julio. En cada una de esas fechas, los dardos seleccionados fueron defoliados manualmente en seis árboles de cada subgrupo y los frutos presentes eliminados en 10 dardos. Esto permitió que cada árbol recibiera el tratamiento de una hormona individual. Inmediatamente después de haber defoliado los dardos y eliminado la fruta, se inyectó en los dardos los siguientes tratamientos: giberelina A_3 (30 μg), giberelina 4/7 (30 μg), ácido indol acético (30 μg), zeatina (20 μg) y bencil adenina (20 μg), cada una de ellas disuelta en 10 μl de etanol-agua (1:1v/v). Estas sustancias fueron introducidas con una microjeringa a través del peciolo de una hoja cuya lámina anteriormente había sido eliminada. Los tratamientos fueron evaluados en la primavera de 1978 al contar número de flores formadas en cada dardo.

Resultados

Los efectos de la inyección de varias hormonas en los dardos del cv Egremont Russet se presentan en las Figuras 1 a 3. Se podrá observar en seis de los ocho tratamientos efectuados el 9 de junio (Figura 1) el marcado aumento en la formación de flores en los dardos tratados con zeatina (Z). El mayor número de flores formadas ocurrió en los dardos sin fruto y con hojas en árboles tratados con daminozida (Figura 1d). Por otro lado, la giberelina A_3 inhibió la iniciación floral en este tratamiento. El retardador de crecimiento también estimuló la floración en dardos defoliados y sin frutos que no recibieron inyección de hormonas (Figura 1b). En la Figura 1g se muestra la inhibición floral por la presencia del fruto a pesar de la existencia de hojas en el dardo; este efecto se subsanó con la aplicación de daminozida (Figura 1c).

En los tratamientos efectuados el 3 de julio las citocininas, zeatina (Z) y bencil adenina (BA) causaron aumento en la formación de flores (Figura 2). En esta ocasión, el tratamiento con ácido indolacético (AIA) indujo iniciación floral en dardos sin hojas y sin frutos (Figuras 2b y f). Este efecto, causado aparentemente por AIA, fue mayor en árboles previamente tratados con daminozida (Figura 2b). Por otro lado, se podrá observar que en términos generales, al igual que en la Figura 1, el mayor número de flores ocurrió en los árboles tratados con el retardante de crecimiento; sin embargo, este efecto pro-

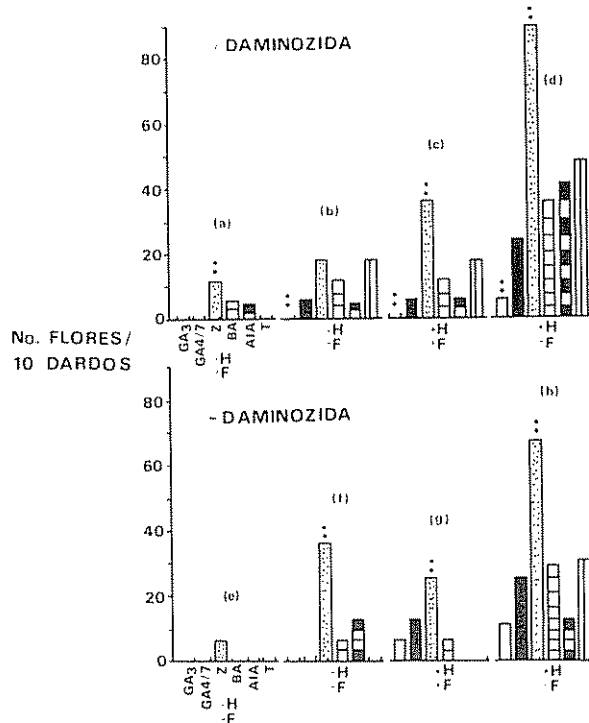


Fig. 1. Formación de flores en dardos del cv Egremont Russet tratados con daminozida (2 000 ppm) o agua (testigo) dos semanas después de la floración. Cuatro semanas después de la misma los dardos fueron selectivamente defoliados (- L), frutos raleados (- F) o dejados intactos (+ L, + F) y tratados con GA_3 , $GA_{4/7}$, zeatina (Z), ácido indol acético (AIA), bencil adenina (BA) o con agua (I). Los resultados se presentan en el mismo orden en a-h. Las diferencias significativas al 1% (***) de probabilidad en cada tratamiento son indicadas.

motor fue antagonizado por la presencia de GA_3 y $GA_{4/7}$ (Figura 2d).

Aunque los tratamientos hechos el 29 de julio se aproximaron a la época en que se inicia la yema floral, las citocininas mantuvieron su efecto promotor en la formación de flores (Figura 3), particularmente en árboles que no recibieron daminozida (Figura 3 e-h). La inyección de AIA nuevamente indujo formación floral (Figura 3 g-h). La acción inhibitoria de las giberelinas observadas en las dos fechas anteriores (Figuras 1 y 2), no ocurrió en este caso.

Discusión

Los resultados en Figuras 1a, 2a, y 3a indican que la presencia de hojas en el dardo parece ser necesaria durante cierto tiempo para que la daminozida pueda tener efectos en la formación de yemas florales en el manzano. La inhibición floral observada en dardos sin hojas o con frutos en esas figuras, coinciden con los

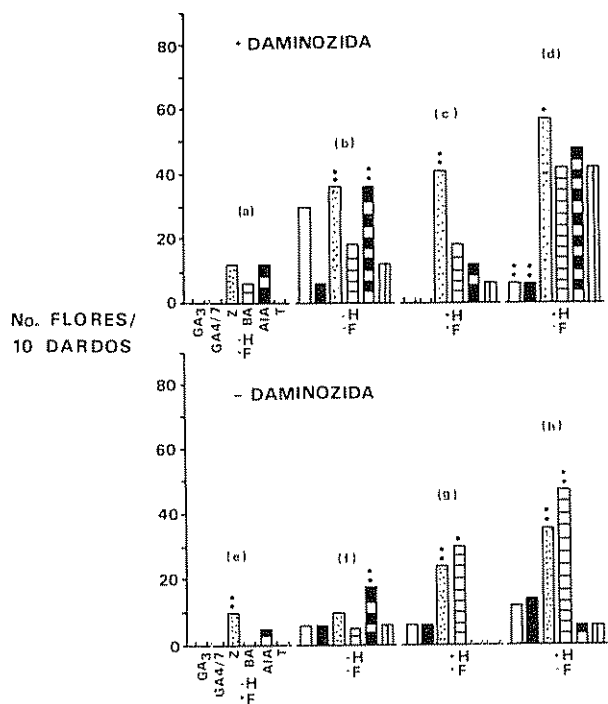


Fig 2 Formación de flores en dardos del cv. Egremont Russet tratados con daminozida (2 000 ppm) o agua (testigo) — dos semanas después de floración. Estos tratamientos (véase la Figura 1) fueron hechos 8 semanas después de la floración. Las diferencias significativas al 5% (*) o 1% (**) de probabilidad son indicadas

resultados reportados por Davis (1) y por Huet (6). La posible función de las hojas en el proceso de iniciación floral en el dardo fue examinada en la sección de introducción en este trabajo. La función que tienen las auxinas en la formación de yemas florales no se conoce con detalle. Por el contrario, los resultados encontrados por varios autores son conflictivos, ya que se ha observado que estas hormonas son capaces de inhibir (10) o estimular (3) la iniciación floral en manzano. En el presente trabajo también se podrá observar que los efectos de AIA fueron inconsistentes. Esto se demuestra al no haber ocurrido cambios significativos en el número de flores después que la sustancia fue inyectada el 9 de junio (Figura 2), y la formación de mayor número de aquéllas cuando fue incorporada al dardo el 3 (Figuras 2b y f) ó 29 (Figuras 3g y h) de julio. Por lo tanto, con estos resultados y los de los autores ya mencionados no es posible concluir en firme la función de las auxinas en el proceso de iniciación floral en esta especie frutal.

El aumento del número de flores causado por citocininas ha sido claramente demostrado (Figuras 1 a 3). Este efecto fue aumentado en árboles previa-

mente tratados con daminozida (Figuras 1b y c; 2c y d, y 3a). Se ha reportado anteriormente el aumento de citocinas en semillas de frutos de manzano cuyos árboles han sido tratados con daminozida (12). Entonces, es posible que este retardante de crecimiento, además de aumentar los niveles de estas hormonas en esos tejidos estimule el transporte de ellas fuera del fruto y una vez localizadas en el dardo, movilizadas hacia la yema meristemática de éste, o alternativa-mente, atrapadas por las hojas y redistribuidas posteriormente hacia la yema en donde inducirían la iniciación floral, hipótesis que apoyaría la sugerencia reportada por Luckwill (8).

La inhibición en la formación de yemas florales causada por giberelinas, cuando se inyectaron el 9 de julio (Figuras 1b y d) o 3 de julio (Figura 2d), concuerdan con los resultados de Dennis y Edgerton (2) y Guttridge (4) quienes reportaron la reducción de yemas florales cuando aplicaron giberelinas en manzano. El efecto inhibitor de estas sustancias desapareció cuando fueron inyectadas el 29 de julio (Figura 3d y h). Una explicación al respecto podría ser que

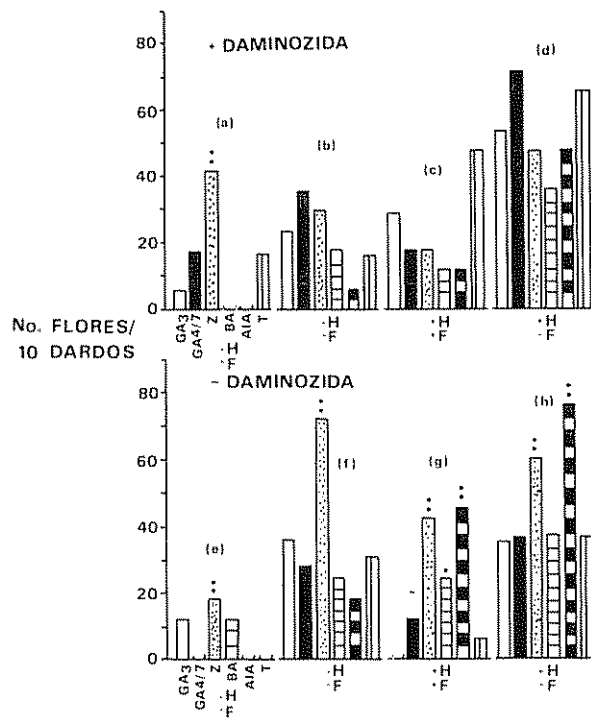


Fig 3. Formación de flores en dardos del cv. Egremont Russet tratados con daminozida (2 000 ppm) o agua (testigo) — dos semanas después de floración. Estos tratamientos (véase la Figura 1) fueron hechos 12 semanas después de la floración. Las diferencias significativas al 5% (*) ó 1% (**) de probabilidad son indicadas

para esa época, la iniciación de la yema floral ya ha tomado lugar. Por otro lado, la promoción floral causada por citocininas en esa época, se podría explicar en términos de receptividad a hormonas específicas por parte de algunas yemas aún meristemáticas en esa especie frutal

Conclusiones

Bajo las condiciones en que se llevó a cabo el presente trabajo, se concluye que en manzano la aplicación de daminozida sola o en combinación con zeatina origina un aumento significativo en la formación de yemas florales. Para que este efecto se presente, se requiere la presencia de hojas en el dardo. Efectos contrarios son producidos cuando las giberelinas substituyen a la zeatina

Resumen

Los efectos de defoliación, raleo de frutos, tratamientos con daminozida e inyecciones de varias hormonas en el dardo, fueron estudiados en relación a la formación de yemas florales en manzano cv Egremont Russett. Los tratamientos con giberelinas inhibieron la iniciación floral mientras que los de zeatina sola o en combinación con daminozida estimularon marcadamente la formación de yemas florales. Los resultados se discuten con base en la posible función de las hormonas en el proceso de la iniciación floral en manzano

3 de mayo de 1982

H. RAMIREZ*
G. V. HOAD**

* Departamento de Horticultura, Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro" Saltillo, Coah., México.

** Long Ashton Research Station, Long Ashton Bristol BS18 9AF, England.

Literatura citada

1. DAVIS, L. D. Flowering and alternate bearing. *Proceedings of the American Society of Horticultural Sciences* 70:545-546. 1957
2. DENNIS, F. G. y EDGERTON, L. J. Effects of gibberellins and ringing upon apple fruit development and flower budformation. *Proceedings of the American Society of Horticultural Sciences* 88:14-24. 1966
3. GROCHOWSKA, M. J. y KARASZEWSKA, A. A possible role of hormones in growth and development of apple trees and a suggestion on how to modify their action. *Acta Horticulturae* 80:457-464. 1978
4. GUTTRIDGE, C. G. Gibberellic acid on apples. Report of the Scottish Horticultural Research Institute (1961-1962):49. 1962.
5. HOAD, G. V. y RAMIREZ, H. La función de las giberelinas sintetizadas en las semillas del fruto para el control de floración en manzano. *Turrialba* 30(3):284-288. 1980
6. HUET, J. Etude des effets des feuilles et des fruits sur l'induction florale des brachyblastes du poirier. *Physiologie Vegetal* 10(3): 529-545. 1972.
7. JACKSON, D. I. y SWEET, G. B. Flower initiation in temperate woody plants. *Horticultural Abstracts* 42:924. 1972.
8. LUCKWILL, L. C. Growth regulators in flowering and fruit development. *Pesticide chemistry in the 20th century* No. 37 of ACS symposium series:203-304. 1977
9. MINNIS, D. C. F. Flower-bud initiation in deciduous fruit trees with particular reference to the apricot. M.Sc. thesis, Lincoln College, Canterbury, N. Z. 1970.
10. RAMIREZ, H. Effects of growth substances on some physiological processes in apple in relation to flower initiation. Ph.D. thesis, University of Bristol, England. 1979. 191 p.
11. RAMIREZ, H. y HOAD, G. V. Efectos del ácido succínico 2,2 - dimetil hidrazida (Daminozida) en los niveles de hormonas endógenas en semillas inmaduras y su relación con la iniciación floral en manzano. *Turrialba* 34(2):252-257. 1984
12. WERZILOV, W. F., PLOTNIKOVA I. V. y ALEXANDROVA, W. S. Growth regulators in relation to apple bud differentiation. *Acta Horticulturae* 80:175. 1978