

ADELAIDA BARRETO*
JEAN-PIERRE SIMON**

Summary

A study was done of the use of electrophoretic technique on polyacrylamide gel for the identification of varieties and for recognizing hybrid progenies in Saccharum. The isoenzymatic patterns were characterized by peroxidases and esterases in nineteen varieties of sugar cane. It was shown possible to distinguish the zymograms of the two systems, given the existing inter-varietal variation, and thus the method may be used as a means of identification. An analysis was done of the S. officinarum (female progenitor) S. spontaneum (male progenitor) cross; and of S. officinarum S. robustum (male parent). The parental band complementarity in the hybrid offspring could provide a possible means of determining the real male progenitor, so long as the maternal material has a smaller number of bands than the paternal material.

Introducción

Los estudios bioquímicos han adquirido recientemente una gran importancia en el campo de la genética. El hallazgo de nuevos métodos aplicables al mejoramiento de plantas ha brindado un apoyo apreciable a los investigadores de este campo.

Las técnicas electroforéticas basadas en la variabilidad existente, para una forma enzimática dada, con relación al peso molecular y a la carga eléctrica, y el mantenimiento de su actividad catalítica, han permitido la confección de patrones isoenzimáticos utilizables en la identificación varietal y en la deter-

minación de las bandas parentales en la progenie híbrida (Gottlieb 6); Ayala (2).

Los métodos de mejora en caña de azúcar necesitan de pruebas de progenie para el análisis de la habilidad combinatoria de los padres. Los mejoradores de caña están interesados en buscar métodos apropiados para determinar con certeza el origen del progenitor masculino de los híbridos que sean posteriormente seleccionados (Iglesias *et al.* 8).

El alto grado de poliploidía existente en *Saccharum* implica que cualquier carácter que desee usarse como marcador genético, no sea heredado en forma dominante, sino que su expresión en el híbrido sea cuantitativa, lo que indicaría poca expresividad y penetración (Price 13); Lewis (10).

El uso de múltiples formas moleculares de enzimas, o isoenzimas, brindan una vía posible de obtener marcadores bioquímicos que faciliten la interpretación y el reconocimiento de híbridos intervarietales o interespecíficos (Lewontin 11); (Johnson 9); Lewis (10). Recientemente se han reportado dos trabajos que indican la probable utilización de isoenzimas para reconocer variedades e identificar cruzamientos entre distintas variedades y especies del género *Saccharum*

¹ Recibido para publicación el 9 de junio de 1981.
Agradecemos la colaboración de Martha Alvarez y Sonia Xiqués, alumnas de 4to. y 3er. año de la Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad de La Habana, prestada durante el desarrollo de esta investigación. Se agradece también la ayuda brindada por el Ing. Mario Amador al facilitarnos las variedades de caña de azúcar con las cuales trabajamos.

* División Caña de Azúcar Instituto de Ciencia Agrícola, Universidad de La Habana.

** Department of Botany and Pylottron Duke University Durham, North Carolina 27706 USA.

(Thom y Naretzki 19); Waldron y Glasziou 20) y para estudiar los procesos evolutivos y relaciones filogenéticas de los géneros afines a *Saccharum* Rougham *et al.* (15); Waldron *et al.* (21). Estudios citogenéticos correlacionados con este trabajo han sido realizados por Barreto y Simon (3).

Materiales y métodos

Se estudiaron 19 variedades de caña de azúcar, representantes de las especies de *Saccharum*, conjuntamente con algunos híbridos simples y complejos. Este material ya había sido analizado citológicamente por Barreto y Simon (3).

La obtención de las muestras se realizó a partir de los trozos de caña de una sola yema, los cuales germinaron en recipientes adecuados a una temperatura ambiente de 25°C. Las yemas de 1.5 a 2 cm se cortaron, clasificaron por variedad, y colocaron en el congelador a -15°C, hasta el momento de hacer los extractos.

De cada variedad se tomaron varias yemas (0.2 g) a las cuales se agregó 200 µl de una solución de sacarosa al 20%. Las muestras se maceraron en un mortero frío y el producto obtenido se transfirió sobre una pieza pequeña de gasa, la cual se exprimió, y el extracto se vertió sobre una placa horadada.

Varias soluciones fueron utilizadas para la extracción, tales como fosfato, Tris-HCl glicina-HCl, soluciones de glucosa a varias concentraciones, ácido ascórbico, y/o 2-mercaptoetanol (0.1-2%). Se optó por estandarizar el procedimiento de extracción con una solución de sacarosa al 20% al no observarse diferencias significativas con los resultados.

La electroforesis se llevó a cabo en un sistema de tampones discontinuo y gel de acrilamida, usado para la electroforesis de disco por Ornstein (12) y Davis (5), y adaptado a la técnica de lámina (slab) vertical (Simon 16, 17; Chapel *et al.* 12). El gel de compactación se preparó con una concentración del 5% Cyanogum-41* en un tampón Tris-HCl 0.1 M, pH 6.7, y el gel de separación con un 9% y 12.5% Cyanogum 41* para isoenzimas peroxidadas y esterasas respectivamente, en buffer Tris-HCl, 0.5 M, pH 8.9. El buffer Tris-glicina 0.04 M, pH 8.3, se empleó en los compartimentos de los electrodos, al cual se le agregó 10 µl de una solución de bromo-fenol azul para marcar con más precisión la banda de Kohlrausch. Se usó un aparato de electroforesis ver-

tical construido por los autores (Chapel *et al.* 12) y simplificado del descrito por Raymond (14).

El tiempo de corrida para la peroxidadas fue de 2.5 a 3 horas de 40 ma y de 4.5 a 5 horas a 30 ma para las esterasas.

La tinción para las isoenzimas de peroxidadas se logró con una solución de 2 g de benzidina di-hidroclórica, disueltos en 14 ml de ácido acético glacial, aforada a 100 ml con agua destilada. Una solución de agua oxigenada (11 volúmenes) al 33% se mezcló con la anterior al momento de la tinción.

El gel se tiñó durante 1-4 minutos en la mezcla preparada; luego se lavó y mantuvo en una solución al 9% de ácido acético glacial. El gel de esterasas se incubó en una solución de ácido bórico 0.5 M, por 1 hora a 5°C (Simon 17), y posteriormente los perfiles isoenzimáticos se obtuvieron al colocar el gel en una solución de 100 ml de solución tampón fosfato, 0.1 M, pH 6.4, con 2 ml de α-naphthyl acetato (1 g de α-naphthyl acetato en 1:1, acetona-agua destilada, para 100 ml de solución; 2 ml de una solución de β-naphthyl acetato (0.3 g de β-naphthyl acetato en 1:1, acetona-agua destilada, para 30 ml de solución) y 200 mg de Fast Blue RR.

Los patrones de bandas peroxidadas y esterasas se dibujaron sobre papel milimetrado, designando como 0 el punto de unión del gel de compactación y separación, y como 100 la situación de la banda 1, la más rápida de la migración anódica.

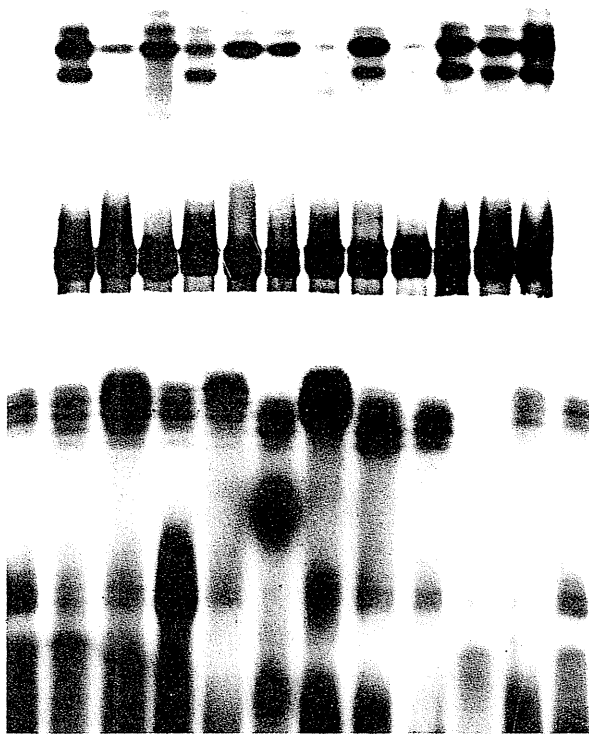
Algunos geles representativos se fotografiaron utilizando el sistema Taucoli, de la ampliadora Durtz, como fuente de contraluz y negativos Panatomic X (blanco y negro), y ORWO CHROMOUT 18 (Placas Y1; Y2), para color.

Resultados y discusión

Patrones isoenzimáticos de especies de *Saccharum*

Los análisis isoenzimáticos realizados en *Saccharum* determinaron la confección de los zimogramas correspondientes de las isoenzimas peroxidadas y esterasas para variedades de las cinco especies (Figuras 1 y 2). Estos se basaron fundamentalmente en el estudio de la zona de bandas más claras y definidas, situada más cerca de la región anódica (+). Las zonas más difusas y semejantes para la mayoría de las variedades, presentes en la zona superior del gel, no fueron consideradas.

* British Drug House, Inglaterra



Placa. Electroforesis en gel de acrilamida de isoenzimas peroxidadas (A) y esterases (B) en variedades de caña de azúcar.

Los patrones de peroxidadas demostraron la existencia de tres bandas comunes (3-4-5), en las variedades estudiadas, las cuales podrían referirse como características del género; en el caso de las esterases se presentan las bandas 2 y 3 como típicas de los perfiles de esta enzima. La afinidad planteada para ciertas bandas de peroxidadas y esterases no implica una falta de variabilidad ya que la presencia de otras permite apreciar la diferenciación intervarietal.

A pesar de la similitud existente en las determinaciones de cada banda para algunas variedades, con relación a una isoenzima determinada, al realizar la comparación para peroxidadas y esterases conjuntamente, se establecen patrones diferentes que permiten la utilización de este método en la identificación de clones de caña de azúcar.

Se presenta una coincidencia estrecha para ambas isoenzimas en las variedades Chunnee y Katha de la especie *S. sinense* y en los clones Burma y Manda-

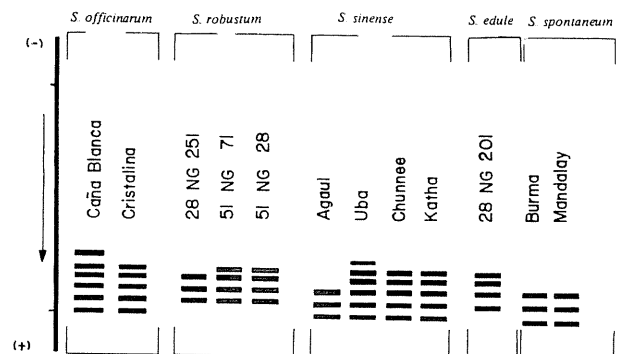


Fig. 1. Zimograma de isoenzimas peroxidasa en 12 variedades de las cinco especies del género *Saccharum*.

lay de la especie *S. spontaneum*. Por esta razón, en situaciones similares los estudios isoenzimáticos se deben basar en un número mayor de enzimas para lograr la diferenciación necesaria en la caracterización.

Waïdron y Glasziou (20), trabajaron con isoenzimas peroxidadas y esterases en caña de azúcar, empleando la técnica de geles con gradientes de concentración de poliacrilamida, empleando variedades comunes a las referidas en este trabajo. Los patrones esterases de los clones 28 NG 251, Chunnee y Uba concuerdan en ambas investigaciones, mientras que en el caso de Mandalay y Burma difieren en una y dos bandas, respectivamente.

Complementación en híbridos interespecíficos

La presencia de bandas isoenzimáticas distintivas en los padres que intervienen en un cruzamiento específico permite observar el fenómeno de complementación de dichas bandas en la progenie híbrida.

Los cruzamientos interespecíficos de este trabajo implican las especies *S. officinarum*, como parental femenino, X *S. spontaneum*, como parental masculino.

La variedad Caña Blanca (*S. officinarum*) utilizada en cruzamiento con las variedades Burma y Mandalay (*S. spontaneum*), presenta un patrón de 6 bandas

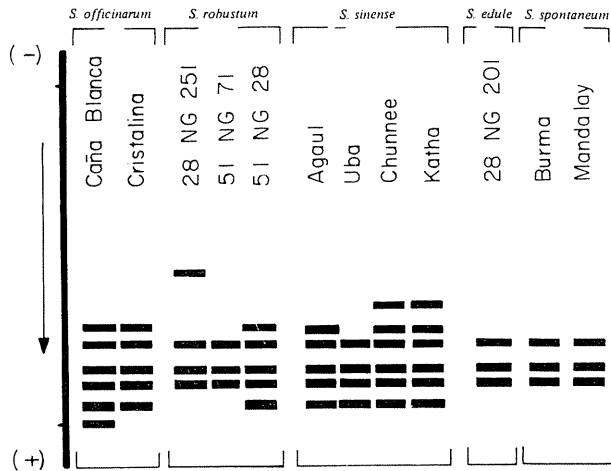


Fig. 2. Zimograma de isoenzimas estereras en 12 variedades de las cinco especies del género *Saccharum*.

para las peroxidadas, siendo la primera la más rápida en migración al polo positivo (ánodo). Las variedades de *S. spontaneum*, muestran solamente las bandas 3-4-5. Los híbridos Ja 55-488 y PB 52-1-5, llevan las bandas de ambos padres, excepto la 1, perteneciente al progenitor femenino (Figura 3).

Los patrones de estereras observados en Caña Blanca consisten de 6 bandas, mientras que en las variedades Burma y Mandalay solo se encuentran las bandas 1-2-3. La progenie híbrida del primer cruce (Ja 55-488), presenta las bandas 1-2-3-4-5, con la ausencia de la 6 perteneciente al parental femenino. El híbrido del segundo cruce (PB 52-1-5), posee las bandas 1-2-3-4, faltándole las 5 y 6 (Figura 4).

Waldron y Glasziou (20), mostraron la presencia de algunas o todas las bandas isoenzimáticas parentales características de una región determinada en las progenies híbridas de los cruces estudiados *S. officinarum* X *S. spontaneum*.

La complementación de bandas parentales en los híbridos de caña de azúcar será válida siempre que parta de material materno con patrones isoenzimáticos de un número menor de bandas, o que existan bandas distintas en los clones usados como progenitores masculinos con relación a dicho material. De lo contrario, podría caerse en un error al plantear como híbrido un producto de autofecundación.

Análisis isoenzimáticos de un cruce *S. officinarum* X *S. robustum* y su autofecundación

Los estudios isoenzimáticos llevados a cabo en este trabajo para el híbrido simple C.P. 36-138 y sus

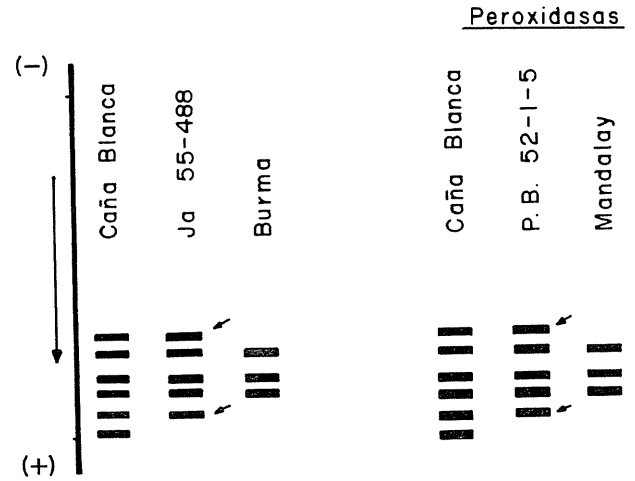


Fig. 3. Complementación de las isoenzimas parentales en híbridos interespecíficos de *S. officinarum* X *S. spontaneum* para peroxidadas. Las flechas indican las bandas complementarias maternas.



Fig. 4. Complementación de las isoenzimas parentales en híbridos interespecíficos de *S. officinarum* X *S. spontaneum* para estereras. Las flechas indican las bandas complementarias maternas.

progenitores, muestran la no complementación de una banda parental diferencial perteneciente al patrón del supuesto progenitor masculino para isoenzimas peroxidadas (Figura 5). El perfil de estereras presenta las bandas 2-3-4-5, siendo esta última característica del parental femenino (Figura 6).

La autofecundación My 53205 muestra las bandas de peroxidadas 2-3-4-5-6 típicas de C.P. 36-138 y la banda 7 única de este clon, mientras que en el patrón de estereras está ausente la banda 2, presente en C.P. 36-138 (Figuras 5 y 6).

La comparación de los patrones isoenzimáticos de C.P. 36-138 con la de sus supuestos progenitores

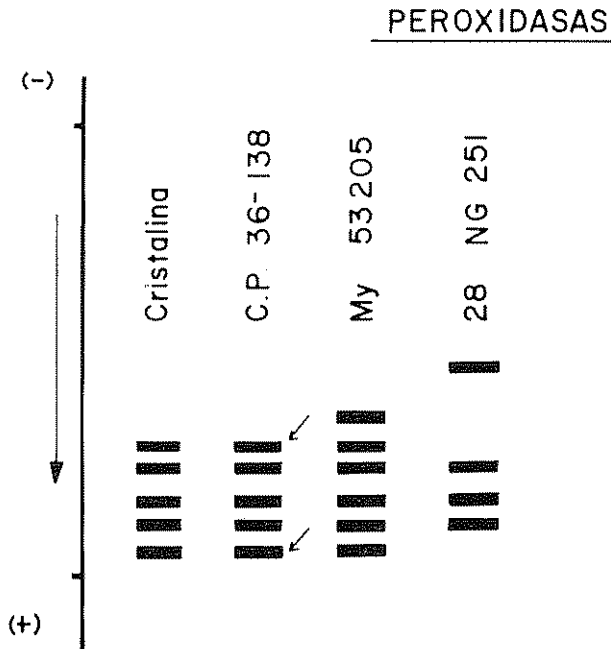


Fig 5. Zimograma de un cruce *S. officinarum* X *S. robustum* y autofecundación. Las fechas señalan las bandas peroxididasas provenientes del progenitor femenino presentes en el híbrido.

plantea, al igual que los análisis citogenéticos (Price 13; Barreto y Simon 3), un origen dudoso para este clon. Sin embargo, cabe recordar que el grado de heterocigosis en variedades de caña de azúcar es alto y la no complementación observada en los patrones enzimáticos de C.P. 36-138 puede deberse también a la expresión génica del proceso de recombinación.

Si bien es cierto, este proceso no incide tanto en la variabilidad de poliploides, ésta puede expresarse si el producto es entre variedades de origen híbrido de alto grado de heterocigosis (Stebbins 18; Lewis 10). La variedad C.P. 36-138 reúne estas características ya que su origen es probablemente el resultado de un cruzamiento interespecífico. Una explicación similar puede proponerse para explicar las diferencias entre los patrones isoenzimáticos C.P. 36-138 y su autofecundación My 53205. En este caso, al autofecundar un clon altamente heterocigoto como el C.P. 36-138, se producirá una progenie variable debido al proceso de recombinación operante. Cabe recordar que estudios citogenéticos (Barreto y Simon 3) han demostrado que la My 53205 posee un número de cromosomas menor que la C.P. 36-138, por lo que es posible que la pérdida de bandas observadas en los patrones isoenzimáticos de My 53205 sean en parte un reflejo de la aneuploidía en el complemento de este clon autofecundado.

Lo planteado para la C. P. 36-138, conjuntamente con el hecho de la aparición de una banda de peroxididasas, hallada solamente en My 53205 y la ausencia de la banda 2 de estererasas con relación a su progenitor C. P. 36-138, debe llevar a un estudio más profundo de estas variedades, fundamentando el análisis en sistemas isoenzimáticos adicionales.

Isoenzimas peroxididasas y estererasas en híbridos complejos

Los patrones de isoenzimas peroxididasas y estererasas de los híbridos complejos analizados se muestran en la Figura 7.

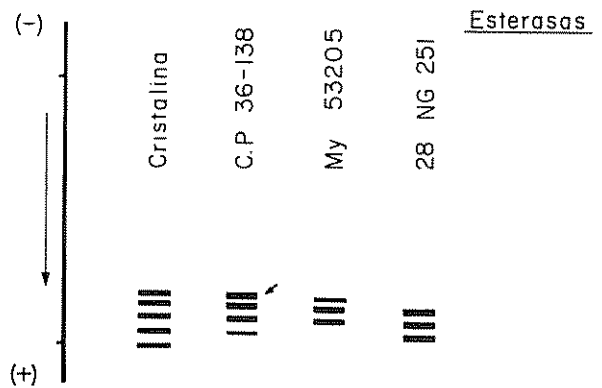


Fig. 6. Zimograma de un cruce *S. officinarum* X *S. robustum* y su autofecundación. Las fechas señalan las bandas estererasas provenientes del progenitor femenino presente en el híbrido.

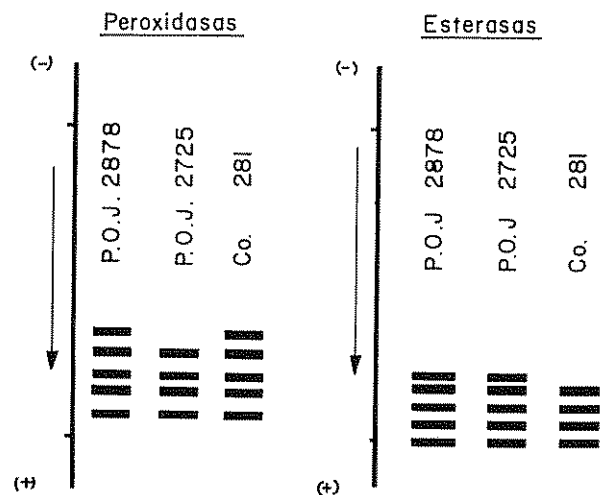


Fig. 7. Patrones de isoenzimas peroxididasas y estererasas en híbridos complejos

Los perfiles de peroxidasa muestran semejanza en la P.O.J. 2878 y en la Co. 281 para las bandas 2-3-4-5 y 6; lo mismo sucede para las esterasas en los clones híbridos P.O.J. 2878 y P.O.J. 2725, llevando las bandas 1-2-3-4-5. La ocurrencia de un mismo patrón isoenzimático, respecto a una isoenzima particular, no inválida la utilización de esta técnica electroforética como una forma posible de identificación de híbridos. La caracterización de isoenzimas distintas permite determinar la diferenciación de dichos materiales.

La electroforesis en gel de acrilamida puede considerarse como un medio más al alcance de los mejoradores de caña de azúcar. El uso de formas moleculares múltiples de una enzima, se ha probado como válido para la identificación de variedades de caña, pues las diferencias intervartiales han sido detectadas a niveles isoenzimáticos para los patrones de peroxidasa y esterasas. El análisis de un número mayor de enzimas ayudaría a una mejor determinación varietal sobre todo en aquellos casos en que pueda existir coincidencia de perfiles.

Los problemas que pueden presentarse con relación a los cruzamientos programados y las progenies híbridas obtenidas, ven como una solución posible la caracterización de los híbridos a partir de sus patrones isoenzimáticos. La probable contaminación con polen extraño puede determinarse mediante los análisis electroforéticos y la incidencia de bandas parentales en el perfil de híbridos; esto facilita al mejorador eliminar aquel material no requerido.

En *Saccharum*, la complementación de bandas de isoenzimas será muy útil siempre que se parta de material parental masculino con un número mayor de bandas, o bandas diferenciales, respecto al progenitor femenino. Los cruces interespecíficos analizados en este trabajo, *S. officinarum* X *S. spontaneum*, *S. officinarum* X *S. robustum*, en los cuales el parental femenino es siempre la especie *S. officinarum* no permiten una verdadera apreciación de este fenómeno, dada la cantidad mayor de bandas que posee ésta comparada con las otras especies.

La posibilidad de expresión del fenómeno de recombinación al nivel isoenzimático en material aloploide segmental, debe tenerse en cuenta en el problema de la complementación (Stebbins 18); Lewis (10), pues puede manifestarse en la presencia o ausencia de algunas de las bandas parentales en la progenie híbrida. El análisis del material híbrido complejo implica la posibilidad de poder utilizar esta técnica como un índice de caracterización de progenies provenientes de cruces intervartiales, siempre

que se utilice más de un sistema isoenzimático. La determinación de progenies híbridas a un nivel isoenzimático brinda un medio más rápido y eficiente que aquella basada en el conteo de cromosomas, debido a los problemas a nivel citogenético que presenta el género *Saccharum*.

Resumen

Se realizó un estudio de la aplicación de las técnicas electroforéticas en gel de poliacrilamida para la identificación varietal y el reconocimiento de las progenies híbridas en *Saccharum*. Los patrones isoenzimáticos fueron caracterizados para peroxidasa y esterasas en 19 variedades de caña de azúcar. Se obtuvo diferenciación de los zimogramas de ambos sistemas, dada la variación intervartial existente, lo que permite la utilización del método como un medio de identificación. Se hicieron análisis de los cruzamientos *S. officinarum* (progenitor femenino) X *S. spontaneum* (progenitor masculino); y *S. officinarum* X *S. robustum* (parental masculino). La complementación de bandas parentales en la progenie híbrida puede servir como una vía posible de determinación del progenitor masculino real, siempre que parta de material materno con un número menor de bandas con relación al material paterno.

Literatura citada

1. AVISE, J. C. Systematic value of electrophoretic data. *Syst. Zool.* 23:465-481. 1974.
2. AYALA, F. J. Molecular evolution. Sinauer Assoc. Inc. Sunderland, Massachusetts, 1976. 425 p.
3. BARRETO, A. y SIMON, J. P. Identificación de progenies y progenitores por el análisis del número cromosómico en *Saccharum*. *Turrialba* 32(3): . 1982.
4. BREWBAKER, J. L., MAHESH, D. U., MAKINEN, U. y MACDONALD, T. Isoenzyme polymorphism in flowering plants. III. Gel electrophoresis methods and applications. *Physiology Plant.* 21:930-940. 1968.
5. DAVIS, B. J. Disc electrophoresis. II. Methods and application to human serum proteins. *Annual N. Y. Academy Science* 121:404-427. 1964.

6. GOTTLIEB, L. P. Electrophoretic evidence and plant systematics. Annual Missouri Botany Gard. 64:161-180. 1979.
7. HEINZ, D. J. y MEC., G. W. P. Morphologic, cytogenetic and enzymatic variation in *Saccharum* species hybrid clones derived from callus tissue. America Journal Botany 58:257-262. 1971.
8. IGLESIAS, L., LIMA, H. y SIMON, J. P. Isosyme identification of zygotic and nucellar seedlings in *Citrus*. J. Hered. 65:81-84. 1974.
9. JOHNSON, G. B. Assessing electrophoretic similarity. Annual Review Ecology Systems. 8:309-328. 1977.
10. LEWIS, W. H. Polyploidy: biological relevance. Plenum Press, New York, 1980. 583 p.
11. LEWONTIN, R. C. The genetic basis of evolutionary change. Columbia University Press, New York, 1974. 352 p.
12. ORNSTEIN, L. Disc electrophoresis. I. Background and theory. Annual N. Y. Academy Science. 121:321-349. 1964.
13. PRICE, S. Cytogenetics of modern sugar canes. Economy Botany 17:97-106. 1963.
14. RAYMOND, S. Acrylamide gel electrophoresis. Annual N. Y. Academy Science 121:350-365. 1964.
15. ROUGHAM, P. G., WALDRON, J. C., y GLASZIOU, K. T. Isozymes in *Saccharum* and related genera. Proceedings Society Sugercane Technology 14:257-266. 1972.
16. SIMON, J. P. Esterase isozymes in the mosquito *Culex pipiens fatigans*. Developmental and genetic variation. Annual Entomology Society America 62:1307-1311. 1969.
17. SIMON, J. P. Differences in thermal properties of NAD malate dehydrogenase in genotypes of *Lathyrus japonicus* willd. (Leguminosae) from maritime and continental sites. Plant, Cell and Environment 2:23-33. 1979.
18. STEBBINS, G. L. Chromosomal evolution in higher plants. Arnold Press, London, 1971. 234 p.
19. THOM, M. y MARETZKI, A. Peroxidase and esterase isozymes in Hawaiian sugarcane. Hawaiian Planter's Record 58:81-94. 1970.
20. WALDRON, J. C. y GLASZIOU, K. T. Isozymes as a method of varietal identification in sugarcane. I.S.S.C.T. Proceedings of the 14th Congress, Louisiana, U.S.A. 249-256. 1972.
21. WALDRON, J. C., GLASZIOU, K. T., DANIELS, J. y GRASSL, C.O. Electrophoretic analysis of isozymes among species of *Saccharum* and allied genera. Proceedings International Society Sugarcane Technology. 15:145-153. 1975.

ARCHIVOS LATINOAMERICANOS DE NUTRICION

ORGANO OFICIAL DE LA
SOCIEDAD LATINOAMERICANA DE NUTRICION

VOL. XXXII
JUNIO, 1982
No. 2

CONTENIDO

	Pág.
EDITORIAL	209
SIMPOSIO SOBRE EL PROBLEMA DEL ENDURECIMIENTO DEL FRIJOL (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	
Introducción — <i>Ricardo Bressani</i>	213
Producción de frijol en Centroamérica, Panamá y el Caribe durante la década de 1970-1980.— <i>Guillermo E. Gálvez</i>	217
Conocimientos actuales sobre el proceso de endurecimiento del frijol.— <i>Luiz G. Elias</i>	233
Efecto de diferentes condiciones de almacenamiento sobre el desarrollo de la dureza del frijol.— <i>Elvira González de Mejía</i>	258
Problemas en el almacenamiento y mercadeo del frijol en Centroamérica y el Caribe.— <i>Yolanda Castillo de Arévalo</i>	275
El significado alimentario y nutricional del endurecimiento del frijol.— <i>Ricardo Bressani</i>	308
Estudios realizados por el CIGRAS sobre el endurecimiento del frijol.— <i>Miguel A. Mora C.</i>	326
Efecto del almacenamiento a temperatura y humedad altas sobre algunas características físicas y químicas del frijol.— <i>Wilfredo Moscoso</i>	342
Prevención del endurecimiento del frijol y aprovechamiento del grano endurecido.— <i>Mario R. Molina, María Eugenia Rizo, Marco A. Baten y Ricardo Bressani</i>	369
Estudios realizados por el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) sobre el problema del endurecimiento del frijol.— <i>Robert A. Luse</i>	401
TRABAJOS DE INVESTIGACION	
Enriquecimiento de pan con harina de soya.— <i>Enrique Yáñez, Digna Ballester, Marcela Aguayo y Héctor Wulf</i>	417
Revisión de los conocimientos actuales acerca de la evaluación del estado nutricional de los ele- mentos minerales. I. Elementos mayores — <i>María Luz Pita Martín de Portela</i>	429
Revisión de los conocimientos actuales acerca de la evaluación del estado nutricional de los ele- mentos minerales. II. Elementos traza.— <i>María Luz Pita Martín de Portela</i>	439
Comportamento do cálcio, fósforo e magnésio em ratas submetidas a desnutrição durante varias etapas no período gestacional.— <i>María Eneida Aiello Sartor, Fernando José de Nóbrega, Suzana de Souza Queiroz Tonete, Cleide Enoir Petean Trindade e Paulo Roberto Curi</i>	450
CARTAS AL EDITOR	463
BIBLIOGRAFIA LATINOAMERICANA	471
NUEVOS LIBROS	479
OTRAS PUBLICACIONES	481
NOTAS	483
CONTENIDO DE LA REVISTA TURRIALBA: Volumen 31, No. 4, 1981	487
CONTENIDO DE LA REVISTA INTERCIENCIA: Volumen 7, No. 1, 1982	489
INFORMACION PARA LOS AUTORES	497