

TURRIALBA

REVISTA INTERAMERICANA DE CIENCIAS AGRICOLAS

VOLUMEN 42

TRIMESTRE JULIO—SEPTIEMBRE 1992

NUMERO 3

CODEN: TURRAB 42(3):287-420

| | |
|--|-------------------------|
| Calidad del cacao en cuatro zonas cacaoteras de Costa Rica E. Cubero, G. Enríquez, A. Hernández, T. Rodríguez | 287 |
| Efecto de la altitud sobre el proceso de fermentación. E. Cubero, G. Enríquez, A. Hernández, T. Rodríguez | 294 |
| General morphology, growing conditions and development of fiber filaments in lechuguilla (<i>Agave lechuguilla</i> Torr.). R.K. Maiti, M.G. Garza de la Riba | 299 |
| Morfología e desenvolvimento das plântulas de <i>Inga fagifolia</i> e <i>I. uruguensis</i> . M.T. Oliveira, C.M. Beltrati | 306 |
| Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on the mixed cropping of maize and beans. G.J.M. Gallotti, L. Zambolim, Cl. Vieira | 314 |
| Determinación de la variación isoenzimática en progenies de <i>Eragrostis curvula</i> (Schrad.) Nees. N. Guzmán, M. Di Renzo, M. Poverene | 321 |
| Aspects of leaf nitrogen metabolism in two cultivars of tomato under water deficit. M. Castrillo, D. García | 327 |
| Compuesto de amplia base genética de maíz tropical. I. Respuesta a la selección. R.E. Preciado | 334 |
| Compuesto de amplia base genética de maíz tropical. II. Variación en las familias. R.E. Preciado | 341 |
| Método de laboratório para avaliação da resistência genética de <i>Coffea</i> spp. a <i>Perileucoptera coffeella</i> . O. Guerreiro Filho, H.P. Medina Filho, A. Carvalho | 348 |
| Respuesta de tres híbridos comerciales de maíz a la inoculación con <i>Ascospiillum</i> . I. García de Salamone, M.A. Monzón de Asconegui, M. Zawosnik, M. Zanchetti | 359 |
| Variabilidad espacial de un suelo bajo vegetación de <i>Prosopis</i> sp. O.A. Bachmeier, E. Buffa | 365 |
| Viabilidade das sementes de <i>Tibouchina urvilleana</i> (DC) Cogn. (Melastomataceae). K.H. Kraemer, A.N. Kämpf, M.E. Alves Aquila | 371 |
| Biochemical markers of variety in <i>Cocos nucifera</i> L. from Yucatan. B. Canto-Canché, E. Quintal-Salazar, M.A. Villanueva | 375 |
| Correlações fenotípicas entre caracteres não destrutíveis e palmito em pupunheiras. M.L. Alves Bovi, L.A. Saes, G. Godoy Junior | 382 |
| Reproducción sexual y partenogénica de <i>Cephalonomia stephanoderis</i> Betrem en Laboratorio. F. Infante, J.F. Barrera, J. Gómez, A. Castillo, W. de la Rosa | 391 |
| Solid and fluid sugarcane fertilization in Brazil. L.C.F. da Silva, A.A. Rodella, J.O. Filho, P.H.C. Luz | 397 |
| Eight year results from provenance trials of <i>Pinus caribaea</i> var. <i>hondurensis</i> , <i>P. oocarpa</i> and <i>P. tecunumanii</i> in the Valle del Cauca, Colombia. J.A. Wright | 401 |
| Notas Técnicas | |
| Hospederos alternos en pentatómido: Implicaciones en el manejo de plagas. E. Daza, A. Pantoja | 408 |
| Efecto de los protozoarios sobre la nodulación en frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>). O. Acuña, C. Ramírez | 411 |
| Observaciones preliminares sobre la diseminación del caldén (<i>Prosopis caldenia</i> Burk.). R. Peinetti, C. Cabezas, M. Pereyra, O. Martínez | 415 |
| Reseñas de libros | 358, 381, 390, 396, 418 |



INSTITUTO INTERAMERICANO DE COOPERACION PARA LA AGRICULTURA

San José, Costa Rica

CR ISSN 0041 - 4360

Calidad del Cacao en Cuatro Zonas Cacaoteras de Costa Rica¹

E. Cubero*, G. Enriquez*, A. Hernández*, I. Rodríguez*

ABSTRACT

Ninety-four samples were collected from four areas of Costa Rica (North, South, Central Pacific and Atlantic zones) during the rainy season and 72 during the dry season. Three analyses were used to determine the fermentation of these samples, all of which were produced by cocoa planters. The results were compared with established values obtained in previous research. Additionally, five other five analyses were used to complement the information. The results showed that the Central Pacific zone was the area where cocoa had the highest fermentation percentage. This area had only recently begun producing cocoa; therefore, the cocoa planters were using improved fermentation techniques. The South zone showed the poorest quality of cocoa, due to the use of plastic bags to drain the pulp from the seeds before drying. Some large cocoa planters and cooperatives had adequate methods of fermentation, and produced cocoa of excellent quality; however, such planters represented only 12% of the total of evaluated production.

INTRODUCCION

La recolección de las mazorcas se realiza durante todo el año conforme alcanzan su madurez. No obstante, se pueden diferenciar épocas de cosecha baja y alta. Los máximos anuales de producción de las áreas cacaoteras del país tienden a ser muy semejantes en el tiempo. Así, una distribución muy parecida, que depende de las condiciones normales de precipitación, es la que se muestra en la Figura 1 (15).

El cultivo del cacao ha representado para Costa Rica una de las principales actividades agropecuarias, tanto por la extensión sembrada, estructura de tenencia de la tierra y su generación de empleo, como por ser una fuente generadora de divisas. Sin embargo, esta actividad se ha visto afectada por una serie de problemas, especialmente a partir de 1979 con la aparición de la moniliasis (enfermedad del fruto causada por *Moniliophthora roreri*), que provocó una fuerte

COMPENDIO

Se recolectaron 94 muestras de cuatro zonas de Costa Rica: Norte, Sur, Atlántica y Pacífico Central, en época lluviosa, y 72 muestras de las mismas zonas en época seca. Se les aplicaron tres análisis químicos y se compararon con valores establecidos en un estudio para conocer su grado de fermentación. Además, para complementar la información, se practicaron otros cinco análisis menos reveladores. Se encontró que la zona del Pacífico Central presentaba el cacao con más alto porcentaje de fermentación. En esa zona, la producción de cacao se está iniciando por lo que se adoptaron algunos métodos recomendados para la fermentación. La zona Sur fue la que mostró la calidad o fermentación más pobre, lo cual se interpreta como consecuencia del uso generalizado de "sacos" (bolsas) para escurrir el cacao, y permitir que la pulpa se desintegre, de manera que no interfiera en el proceso de secado. Algunas cooperativas y productores de fincas grandes poseen métodos adecuados para fermentar el cacao y obtienen una calidad buena; sin embargo, representan únicamente un 12% del total de la producción evaluada.

contracción y un impacto socioeconómico relevante en detrimento del área principal de producción (litoral del Atlántico). A partir de entonces, el país ha realizado una serie de esfuerzos para recuperar esta actividad, los cuales, no obstante, han carecido de coordinación y dirección responsable. Los productores de cacao, en su mayoría, realizan el proceso de fermentación en forma deficiente e incluso no lo llevan a cabo.

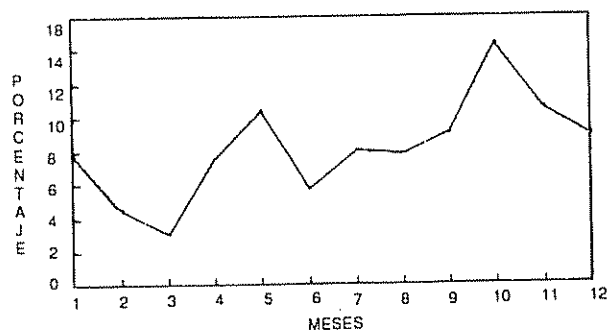


Fig. 1. Porcentaje de la producción anual de cacao seco en grano, en Costa Rica. Los valores corresponden al promedio obtenido para diez años de seguimiento de la producción.

¹ Recibido para publicación el 7 de setiembre de 1990

* Centro de Investigación en Productos Naturales (CIPRONA), Universidad de Costa Rica

Por lo general, el cacao, una vez recolectado, puede seguir diferentes rutas:

- Algunos productores lo venden húmedo a un intermediario a precios bastante bajos.
- Otros agricultores hacen uso del secado solar sin una fermentación previa.
- Muchos productores, a pesar de que cuentan con instalaciones, llevan a cabo el fermentado, secado y almacenamiento del cacao de manera rudimentaria e irregular, porque carecen de las técnicas básicas para la obtención de un producto de buena calidad para el mercado (17).
- Unos pocos practican un buen proceso de fermentación y de secado.

Para mejorar esta situación, no sólo se requieren programas para el beneficiado correcto, sino también parámetros confiables para medir el progreso. Por lo tanto es importante contar con los métodos adecuados para evaluar la calidad del grano que producen los agricultores en el país.

El objetivo de este estudio fue evaluar las zonas productoras de cacao y la calidad del grano, con base en el grado de fermentación.

MATERIALES Y METODOS

Se tomaron muestras de cuatro zonas del país en dos épocas de cosecha diferentes: lluviosa y seca, las cuales coinciden, respectivamente, con la mayor y menor producción de cacao durante el año. La escogencia se basó de acuerdo con lo indicado en la Figura 1. En cada época se recolectaron muestras del intermediario o, en su defecto, del productor. El recorrido fue el siguiente:

- Zona Atlántica: Guácimo, San Isidro, Herediana, Siquirres, 28 Millas, La Lola, Matina, Limón centro, Valle de la Estrella, Peshurst, Cahuita, Puerto Viejo, Bri Bri, Bambú, Suretka, Shiroles, Amubri.
- Zona Norte: La Victoria, Horquetas, Finca Experimental de la Universidad de Costa Rica (UCR) y Finca Agua en Río Frío, Coopesancarlos, Ciudad Quesada, San Rafael de Guatuso, Upala, Chachagua, Venecia, Montealegre de Cutris, Paso Real de Cutris, Molino de la Vega, San Isidro de Peñas Blancas, Pavón de Los Chiles, Valle Azul,

Veracruz, Moravia de Cutri, Platanar, La Gloria, La Fortuna, La Palmera y Santa Rita de Río Cuarto.

- Zona Sur: San Isidro del General, Palmares de San Isidro, Palmar Norte, Río Claro, Golfito, Ciudad Neilly, Corredores, Laurel, Bella Luz de La Vaca, Río Claro, Coopalca del Sur, Coopalsur, Coopropalca.
- Zona Pacífico Central: Mastatal y Zapatón de Puriscal, Parrita, Coopefruta en Villa Nueva de Quepos, Coopesilencio en Dominical, Hatillo Viejo, cerca de Dominical.

La toma de las muestras de cacao, correspondiente a la época lluviosa (cosecha principal), se realizó en la última quincena de octubre y la primera de noviembre de 1988. Se recogieron 94 muestras. La siguiente recolección se hizo en la primera quincena del mes de abril de 1989 (época seca). Se recorrieron los mismos lugares; sin embargo, en esta época la producción disminuye y no fue posible obtener muestras de algunos lugares, pero sí de sitios donde anteriormente esto no se logró. En total se recogieron 72 muestras.

Se extrajeron muestras de 1 kg de la totalidad de los sacos encontrados en cada local y cada una fue tomada de diferentes partes del saco. Si el número de sacos era mayor de diez, se tomaba una segunda muestra.

Se realizó una encuesta entre los intermediarios y agricultores, con el fin de identificar correctamente las muestras y conocer el tratamiento poscosecha que recibieron.

El diseño estadístico aplicado fue un factorial de 4 x 2, donde los factores por evaluar fueron: zona productora con cuatro niveles y época del año con dos niveles.

Las muestras de la época lluviosa y las de la época seca se analizaron para determinar el contenido de humedad (9), el pH (2), el porcentaje de ceniza (11) y las antocianinas (6): estos últimos tres análisis fueron los indicadores del grado de fermentación. Todos los resultados se indican en base seca.

RESULTADOS Y DISCUSION

En el Cuadro 1 se observa que el análisis de pH sufrió variaciones más pronunciadas entre los lugares, que en relación con las épocas evaluadas, mientras que las antocianinas y el porcentaje de ceniza estuvieron mayormente afectados por la época que por la zona.

Cuadro 1. Valores promedio de pH, porcentaje de ceniza y antocianinas, correspondientes a cacao híbrido (*Theobroma cacao*) en cuatro zonas cacaoteras, en dos épocas diferentes de cosecha.

| ZONAS | EPOCA | | Media zona |
|------------------|----------|---------|------------|
| | Lluviosa | Seca | |
| Atlántica | 5.94 b | 6.26 a | 6.10 A |
| Norte | 5.92 bc | 5.85 b | 5.89 B |
| Sur | 6.10 a | 5.74 bc | 5.93 B |
| Pacífico Central | 5.72 c | 5.48 c | 5.60 C |
| Media época | 5.92 A | 5.83 A | |

| ZONAS | CENIZA (%) | | Media zona |
|------------------|------------|--------|------------|
| | Lluviosa | Seca | |
| Atlántica | 2.84 c | 3.28 b | 3.06 B |
| Norte | 2.84 c | 3.33 b | 3.09 B |
| Sur | 2.79 c | 3.61 a | 3.20 A |
| Pacífico Central | 2.88 c | 3.28 b | 3.08 B |
| Media época | 2.84 B | 3.37 A | |

| ZONAS | ANTOCIANINAS (abs) | | Media zona |
|------------------|--------------------|---------|------------|
| | Lluviosa | Seca | |
| Atlántica | 1.159 c | 2.586 a | 1.872 A |
| Norte | 0.782 dc | 1.766 b | 1.274 B |
| Sur | 1.054 dc | 1.710 b | 1.382 B |
| Pacífico Central | 0.442 e | 0.827 c | 0.634 C |
| Media época | 0.859 B | 1.722 A | |

Promedios con la misma letra entre columnas o hileras no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan (P<0.05).

Análisis de pH

Hubo diferencias significativas estadísticas de pH entre las zonas (Cuadro 1 y Fig. 2), lo cual era de esperarse, ya que el pH está relacionado con el tratamiento que se le brinde al cacao y el lugar donde se encuentre el árbol afecta el grado de acidez. Así, por ejemplo, una sombra escasa sobre el árbol provoca que se desarrolló 60% más de acidez libre total que en árboles jóvenes con sombra media o excesiva (7, 12). Además, el grado de madurez con que se recolectaron las mazorcas puede afectar el proceso de fermentación, y esta pudo controlarse en los agricultores estudiados. Si la mazorca se recolecta sin estar madura, la pulpa tendrá un contenido más bajo de azúcares, lo cual provocará menor generación de ácido, por lo que la fermentación será más lenta.

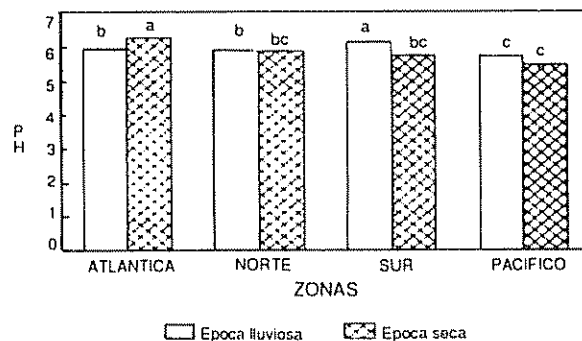


Fig. 2. Resultados del análisis de pH practicado a cacao de cuatro zonas de Costa Rica en dos épocas del año

En la Zona Atlántica, el cacao presentó el pH más alto y en el Pacífico Central el más bajo de acuerdo con los promedios totales. Evaluando este comportamiento en cada una de las épocas, se determinó que en la época lluviosa el pH más alto era del cacao de la Zona Sur, le siguieron los de las zonas Atlántica y Norte, entre las que no hubo diferencias estadísticas significativas, y finalmente el de la zona del Pacífico Central. En la época seca, el cacao de la Zona Atlántica fue el que mostró el pH más alto, le siguieron el de las zonas Norte y Sur (entre las que no hubo diferencias estadísticas significativas) y finalmente el de la zona del Pacífico Central (Cuadro 1 y Fig. 2). Únicamente las muestras del Pacífico Central en ambas épocas y las de la Zona Sur en época seca indicaron que estaban bien fermentadas, de acuerdo con el Cuadro 2.

Cuadro 2. Valores asignados a cada análisis de acuerdo con el grado de fermentación, aplicados al cacao en grano seco (*Theobroma cacao*), para conocer su calidad.

| Análisis | Bien fermentado | Mal fermentado | Sin fermentar |
|--------------------------------|-----------------|----------------|----------------|
| Peso seco (g) | 1.043 - 1.689 | | 0.902 - 1.1546 |
| Ceniza (%) | < 3.40 | | > 3.40 |
| pH | 4.95 - 5.75 | 5.75 - 6.55 | 6.55 - 7.05 |
| Acidez total (ml NaOH 0.1 M/g) | 6.06 - 2.56 | 2.56 - 2.21 | 2.21 - 1.14 |
| Nitrógeno total (%) | < 2.02 | | > 2.02 |
| Nitrógeno soluble (%) | 1.12 - 0.21 | | 1.55 - 0.42 |
| Grasa (%) | 44.96 - 61.45 | | 50.03 - 58.08 |
| Polifenoles totales | < 3.00 | | > 3.00 |
| Taninos | < 3.36 | | > 3.36 |
| Antocianina (absorbancia) | 0.057 - 0.244 | 0.244 - 0.794 | 0.794 - 2.564 |

Los resultados se calcularon en base seca, excepto el análisis de antocianinas y pH

Según la información recopilada por medio de las encuestas, la Zona Pacífico Central es un lugar donde los agricultores, por trabajar con un producto nuevo para ellos, están aprendiendo a manejarlo adecuadamente y usan algunos métodos de fermentación, lo que justifica que sea la única zona con un pH bajo dentro del límite aceptado como bien fermentado de acuerdo con el Cuadro 2. En las zonas Atlántica y Sur, antes de la aparición de la monilia en 1979, se escurría el cacao en sacos y era suficiente para lograr un cacao de sabor aceptable, pues se cultivaba un cacao acriollado; sin embargo, después de 1979 se introdujo al país un híbrido con un cruce forastero para lograr resistencia a las enfermedades y mayor productividad, el cual requiere por lo menos cinco días para fermentarse, si se usa un buen sistema. Los cacaoteros pequeños, que son la mayoría (17), no integraron estos cambios al manejo poscosecha y por tradición siguen usando el método de sacos. Estas zonas, por lo tanto, fueron las más problemáticas en cuanto al tratamiento poscosecha dado al cacao. Muy pocos productores utilizaron buenos sistemas de fermentación como fue el caso de Coopesancarlos, Coopalca del Sur, de algunos agricultores independientes en San Isidro del General, Quepos, Upala y Pejibaye de Turrialba.

No se presentaron diferencias estadísticas significativas entre los materiales de las dos épocas de cosecha, de acuerdo con los promedios totales; sin embargo, al analizar cada zona se observó que en la Zona Atlántica el cacao tenía un pH más alto y en la Zona Sur, uno más bajo durante la época seca (Cuadro 1 y Fig. 2). Aunque se esperaba mayor acidez durante la época lluviosa en el grano de todas las zonas, ya que la pulpa está más húmeda y permite que la fermentación dure los días requeridos para obtener una buena calidad; al contrario, una pulpa seca al cabo de tres días no se puede fermentar más, pues ya no hay humedad y los granos se empiezan a pegar entre sí.

En la Zona Atlántica, como se esperaba, el pH fue mayor en el cacao de la época seca; sin embargo, no hubo diferencia en la precipitación entre las dos épocas, por lo que tampoco existió en la medición de pH. La explicación puede enfocarse desde la cantidad de masa por fermentar; puesto que, según los agricultores, durante el período de enero a abril la cantidad de cacao cosechado disminuye (Fig. 1), lo cual puede condicionar al productor a no escurrir el cacao y mucho menos a fermentarlo correctamente. Pequeñas cantidades de cacao no se pueden fermentar (18), pues al colocar poca masa de cacao en los sacos, en montones o en cajas para

fermentarlo, no ocurre el aumento necesario de temperatura, por lo que no se producen los cambios deseados dentro del cotiledón. Si el agricultor cosecha poco cacao en baba, no lo va a escurrir sino que lo lava y lo seca, de acuerdo con las encuestas realizadas.

Probablemente, en las otras dos zonas Norte y Pacífico Central, no hubo diferencias en el pH del cacao entre las dos épocas del año, debido a que los dos efectos se compensan. En la época lluviosa hubo más pulpa, pero la temperatura de fermentación fue más baja; mientras que en época seca se tuvo menos pulpa, aunque la temperatura ambiente fue mayor. Además, el procedimiento utilizado para la fermentación en estas zonas es más eficiente y se aplica con mayor regularidad que en los otros dos lugares.

Porcentaje de ceniza

Se presentaron pocas variaciones en el cacao en cuanto al contenido de cenizas, al comparar los promedios totales de las cuatro zonas (Cuadro 1); únicamente la Zona Sur mostró mayor porcentaje de cenizas. Al evaluar las zonas, en cada una de las épocas, se observa en el Cuadro 1 y en la Figura 3 que, en la época seca, el cacao de la Zona Sur contiene mayor cantidad de cenizas que el de las otras tres zonas, mientras que en la época lluviosa no se presentaron diferencias estadísticas significativas entre las cuatro zonas. Se esperaba que hubiera pocas diferencias entre los materiales de las zonas, dado que la exudación de las cenizas se puede ver afectada solo de dos maneras: primero, por la temperatura de fermentación, que depende de la cantidad de masa que se fermente, del sistema empleado y de la altitud de la zona; segundo, por la humedad del medio. Las cuatro zonas tienen cacao con una humedad semejante, ya sea de época lluviosa o seca; el escurrido es el método que se practica con mayor frecuencia y como están a una misma altitud sobre el nivel del mar, los cambios sufridos en el cotiledón fueron similares en ellas. La Zona Sur fue la única que presentó cacao diferente, y no se dio una explicación satisfactoria; podría pensarse que el tipo de suelo y clima influyen en ello, pero no se pudo comprobar esta hipótesis.

Existe una contradicción en la Zona Sur durante la época seca, pues el pH indicó cacao bien fermentado, pero las cenizas señalaron que no recibió ningún proceso de fermentación. La explicación es que la humedad de la pulpa influye de dos formas sobre el proceso: por ser la pulpa más seca permite que el aire circule libre-

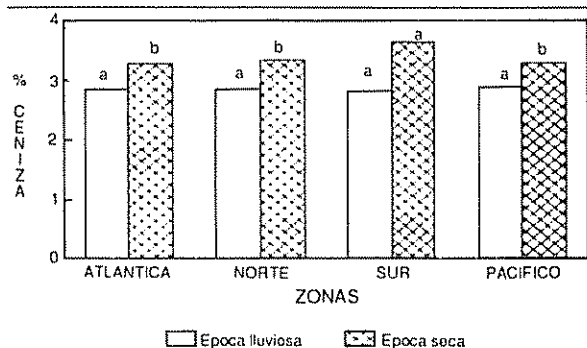


Fig. 3. Resultados del porcentaje de ceniza practicado a cacao de cuatro zonas de Costa Rica en dos épocas.

mente entre los granos, eso favorece la oxidación de etanol a ácido acético (13), sin embargo, la escasez de líquido impide la migración de las cenizas.

Al comparar las épocas, se encontró durante la seca mayor cantidad de cenizas que en la lluviosa; este fue el comportamiento del cacao en las cuatro zonas. A pesar de que Alvarado, Villacís y Zamora (1) no encontraron diferencias estadísticas significativas en el contenido de cenizas durante los meses que analizaron; Quesnel (14), sin embargo, indicó que la fase anaeróbica es más larga en la estación húmeda, lo cual provoca que haya mayor exudación de sustancias solubles.

De las muestras de la época lluviosa las de la Zona Sur fueron las únicas que indicaron que no hubo fermentación, las demás se encontraron en el ámbito de cenizas para cacao bien fermentado; mientras que en la época seca, todas las zonas presentaron valores de ceniza para cacao no fermentado (Cuadro 2).

El agricultor, durante la época lluviosa, debe escurrir el cacao en bolsas de polietileno, cuando no aplica un método adecuado de fermentación (gavetas Rohan, montones, cajones, otros), para remover la pulpa antes de secar el cacao; de otra manera, la pulpa impide alcanzar un porcentaje de humedad bajo durante la etapa de secado solar. En época seca, poca pulpa rodea a la semilla y, además, la cosecha de mazorcas es baja, lo que provoca que no el escurrido sea menor de tres días y, en algunos casos, ni siquiera se hace; así, la exudación de cenizas es poca o nula. Además, si en ambos periodos se aplica el escurrido, la baja humedad afecta negativamente el proceso, pues en condiciones secas, disminuyen los procesos microbiológicos y bioquímicos de la cura, y el movimiento de sustratos, enzimas y de compuestos que se exudan es menor (8).

Contenido de antocianinas

La mayor cantidad de antocianinas se encontró en el cacao de la Zona Atlántica, le siguieron en magnitud el de las zonas Norte y Sur, y finalmente, el del Pacífico Central (Cuadro 1); de acuerdo con los promedios totales, se mantuvo la tendencia antes descrita tanto en la época seca como en la lluviosa (Fig. 4).

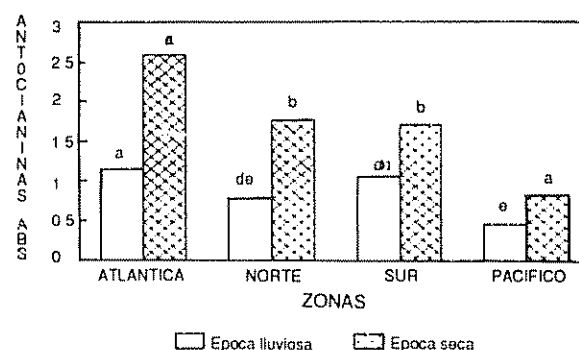


Fig. 4. Resultados del análisis de antocianina practicado a cacao de cuatro zonas de Costa Rica en dos épocas.

En relación con el Cuadro 2, los valores para el Pacífico Central y la Zona Norte, durante la época lluviosa, se encontraron dentro del ámbito de cacao mal fermentado, y las otras zonas, en el del cacao sin fermentar. Eso se debió a que los productores del Pacífico Central usaron mejores sistemas de fermentación, con lo que se confirma lo expuesto por Vargas y Soto (17), quienes señalan que los agricultores, en su mayoría, utilizan el método de bolsas de polietileno para darle tratamiento poscosecha al cacao, con el cual se impide que ocurran todas las reacciones enzimáticas y oxidativas deseables para obtener un cacao de buen sabor.

El cacao de las cuatro zonas estudiadas presentó, durante la época seca, mayor cantidad de antocianinas que en la lluviosa (Fig. 4); porque la poca humedad en la estación seca, tanto en la pulpa como dentro del cotiledón, retardó las reacciones bioquímicas (8, 13, 16). Además, en época seca muchos agricultores no colocan el cacao en las bolsas, ya sea porque se recolecta muy poco, o porque la pulpa está tan seca, que, si lo hacen, corren el riesgo de no secar bien el cacao, ya que los granos se aglomeran en una pulpa poco húmeda, pero azucarada. En época lluviosa, el cacao presentó menos pigmentos, aunque no valores suficientemente bajos como para considerarlos mal o bien fermentados de acuerdo con el Cuadro 2, puesto que los productores,

en su mayoría, colocan el cacao en bolsas de polietileno por tres días, sin removerlo, para destruir la pulpa. En esos tres días, apenas se le da tiempo para que muera el embrión y cuando las enzimas están empezando a actuar sobre el sustrato, se detiene el proceso, por lo que no se logra la hidrólisis total de los pigmentos.

Otros análisis

En el Cuadro 3 se encuentran los resultados para los análisis de acidez total, porcentaje de grasa, de polifenoles totales y humedad, y peso seco del grano de cacao, para muestras recolectadas en época lluviosa. Al comparar estos valores en promedio con los valores es-

Cuadro 3. Acidez total, porcentaje de polifenoles totales y grasa y peso seco correspondientes a cacao recolectado en cuatro zonas de Costa Rica (1989)

| Zona | Acidez total | Polifenoles totales | Grasa seco | Peso |
|-----------|--------------|---------------------|------------|------|
| Atlántica | 4.22 | 15.33 | 53.57 | 1.16 |
| Norte | 4.16 | 12.81 | 52.83 | 1.14 |
| Sur | 3.62 | 14.54 | 53.42 | 1.14 |
| Pacífico | 5.44 | 12.81 | 54.42 | 1.18 |

tablecidos en el Cuadro 2, se observa que las cuatro zonas presentaron una acidez total correspondiente a cacao bien fermentado, entre 2.56 y 6.06; sin embargo, el porcentaje de polifenoles totales mostró valores para cacao sin fermentar. Esta contradicción se explica por los métodos utilizados por los agricultores para fermentar el cacao, donde el más común es el de bolsas de polietileno; este procedimiento permite que una gran cantidad de ácido se genere sin que la temperatura del sistema se eleve mucho, por lo que no hay muerte del embrión dentro de las primeras 48 h de fermentación, de manera que cuando los agricultores secan el cacao, las enzimas no han podido actuar sobre los polifenoles.

Estos análisis no coinciden con las tendencias del análisis de pH y de antocianinas; sin embargo —ya se mencionó— son los que logran separar mejor el cacao fermentado de aquel sin fermentar; por lo tanto, los resultados obtenidos de ellos son más confiables.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

— El cacao de la Zona Sur presenta una calidad inferior en comparación con las otras zonas. El

Pacífico Central es la zona que produce un cacao de mejor calidad, aunque requiere mejorar sus sistemas de fermentación.

- La época de fermentación influye directamente sobre la calidad del grano. Durante la época lluviosa se produce cacao de mejor calidad, en términos de porcentaje de ceniza y antocianinas, que durante la temporada seca.
- Un 12% de la producción evaluada presenta un cacao bien fermentado y corresponde al beneficiado por algunos productores y cooperativas en forma aislada que usan sistemas de fermentación adecuados.
- Se recomienda realizar un estudio con el fin de mejorar las condiciones de la fermentación durante la época seca, para que los granos se puedan fermentar cinco días sin que se aglomeren.
- Se sugiere que los agricultores se asocien y establezcan sistemas adecuados de fermentación, que, de otra forma, no podrían conseguir; además, la masa por fermentar sería mayor con lo que se favorecería la temperatura del proceso.

LITERATURA CITADA

1. ALVARADO, J.; VILLACIS, F.; ZAMORA, G. 1983. Efecto de la época de cosecha sobre la composición de cotiledones crudos y fermentados de dos variedades de cacao y fracciones de cascarilla. Archivos Latinoamericanos de Nutrición 33(2): 337-355
2. ANALYTICAL METHODS OF AOAC 1984. 14 ed S Williams (Ed.) EE.UU., AOAC. p 187, 199.
3. BAREL, M. 1987. Délai d'écabossage: Influence sur les rendements et la qualité du cacao marchand et du cacao torréfié. Café, Cacao, Thé 31(2):141-150.
4. CROS, E.; ROULY, M.; VILLENEUVE, F.; VINCENT, J. 1982. Recherche d'indice de fermentation du cacao II. Estimation de la matière colorante rouge des fèves de cacao. Café, Cacao, Thé 26(2):115-121
5. CROS, E.; VILLENEUVE, F.; VINCENT, J.C. 1982. Recherche d'indice de fermentation du cacao: Evolution des tanins et des phénols totaux de la fève. Café, Cacao, Thé 26(2):109-114.
6. CHASSEVENT, F.; D'ORNANO, M. 1966. La détermination photométrique des pigments du cacao: Essais de la méthode internationale de l'OICC et de quelques variantes. Café, Cacao, Thé 10(3):243-266.

7. CHICK, W.; MAINSTONE, B.; WAI, S. 1981. Mitigation of cocoa acidity in peninsular Malaysia. In Cocoa Producer's Alliance. International Cocoa Research Conference. (8., Col.) p.759-764.
8. DE WITT, K. 1956. Nitrogen metabolism in fermenting cacao: A report in cocoa research, 1955-56. Tri. p. 54-57.
9. ECUADOR. 1975. Cacao en grano: Determinación de humedad Ecuador. Instituto Ecuatoriano de Normalización. 3 p.
10. EDGE, N.E.; OWOLABI, C.A. 1972. Quality of Nigerian commercial cocoa beans. Turrialba 22(2):150-155.
11. LEES, R. 1969. Manual de análisis de alimentos. Zaragoza, Acribia. 231 p.
12. LEHRMAN, D.; PATTERSON, G. 1983. Cocoa fermentation. Biotechnology 5:529-575.
13. LOPEZ, A. 1984. Limitação da "prova de corte" no controle de qualidade do cacau comercial. Revista Theobroma 14(3):199-207.
14. QUESNEL, V. 1971. Química y tecnología de la cura del cacao. Boletín informativo (Ven.) 8(2):17.
15. RAMIREZ, J.M. 1988. Comportamiento de la producción de cacao en Costa Rica, a través del año. Costa Rican Cocoa Products. Comunicación personal.
16. ROHAN, T. 1964. El beneficio del cacao bruto destinado al mercado. Roma, FAO. Estudios Agropecuarios 60:150.
17. SOTO, J.; VARGAS, V. 1989. Investigación de métodos de fermentación de cacao (*Theobroma cacao* L.) para pequeños agricultores en seis localidades de Costa Rica. Tesis de Ing. Agronómica. Turrialba, Universidad de Costa Rica. 80 p.
18. VARGAS, J. 1988. Comparación de la fermentación de pequeñas cantidades (25, 37,5 y 50 g) de cacao (*Theobroma cacao*) en tres diferentes altitudes de Costa Rica. Tesis Ing. Agr. Turrialba, Universidad de Costa Rica. 102 p.

Efecto de la Altitud sobre el Proceso de Fermentación¹

E. Cubero*, G. Enríquez*, A. Hernández*, T. Rodríguez*

ABSTRACT

Sixteen samples were taken of four cocoa varieties, two of "fine" and two of "bulk" cocoa, both fermented and unfermented. The samples were from two different altitudes. Ten chemical analyses were used to determine the effect of altitude on the fermentation. The samples from 40 masl showed more severe changes than those from 600 masl, except for pH and total acidity. The room temperature at altitudes near sea level helped to reach higher temperatures during fermentation, which could also be maintained longer than the temperatures reached at higher altitudes. Chemical reactions and other changes during fermentation were shown to be more rapid.

INTRODUCCION

La fermentación es indispensable para obtener una buena calidad de cacao procesado. En efecto, un chocolate elaborado a partir de almendras no fermentadas se caracteriza por una fuerte astringencia, y una ausencia de aroma; mientras que el elaborado a partir de almendras fermentadas se caracteriza por una débil astringencia, una amargura aceptable y un sabor bien desarrollado (4).

Se conoce poco sobre el ambiente y los efectos genéticos en la química de la semilla, lo que significa cualquier diferencia en la fermentación (11).

Phillips, citado por Pardo (15), observó, en dos épocas de cosecha, diferencias en la velocidad de calentamiento del cacao durante las fermentaciones. Allison y Kenten, también citados por Pardo (15), demostraron que el mayor incremento de temperatura logrado con el cacao de la cosecha principal, no era debido a la

COMPENDIO

Se recolectaron 16 muestras de cacao, de cuatro genótipos diferentes, dos acriollados y dos forasteros, fermentados y sin fermentar, procedentes de dos diferentes altitudes sobre el nivel del mar; se les aplicaron diez análisis químicos con el fin de determinar el efecto producido por la altitud sobre la fermentación. Los cambios más marcados durante la fermentación se presentaron en las muestras correspondientes a 40 metros sobre el nivel del mar, excepto para el pH y la acidez total. La temperatura del ambiente de las zonas en altitudes cercanas al nivel del mar favorecen una temperatura mayor durante el proceso de fermentación, el cual se produce antes que en zonas más altas, y se mantienen por más tiempo; eso permite que las reacciones y cambios a 40 msnm sean más rápidas.

temperatura ambiental, sino a un mucílago más húmedo, consecuencia de una precipitación mayor durante el desarrollo de la mazorca.

Romeu (17) detectó una variación en la acidez de las almendras, que dependió no sólo de la época de cosecha y fermentación, sino también del lugar de procedencia del cacao.

La escasez de agua o de nutrimentos en el suelo puede variar la composición bioquímica de los cotiledones (10). La deficiencia de cobre puede disminuir la formación de la enzima polifenoloxidasas y provocar una mayor astringencia en el cacao procesado.

Rohan y Wood, a quienes también se refiere Pardo (15), indican que las condiciones externas, tales como temperatura ambiental muy baja y alta humedad relativa en el momento de la fermentación, pueden retrasar e inclusive impedir el ascenso de la temperatura de la masa, formándose las llamadas fermentaciones "muertas" o "babosas".

Ramírez (16) señala que las temperaturas generadas por cuatro sistemas de fermentación de pequeñas cantidades, en la localidad de Turrialba (600 msnm), se mantuvieron por debajo del nivel térmico producido en

¹ Recibido para publicación el 7 de setiembre de 1990

* Centro de Investigación en Productos Naturales (CIPRONA), Universidad de Costa Rica.

localidades situadas a alturas inferiores a los 80 msnm, de modo que a mayor altitud la fermentación se demora más tiempo y se deduce que la velocidad e integridad del proceso, en una zona como Turrialba, son menores que en otras localidades más bajas, donde las fases del proceso no se desarrollan adecuadamente.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron cuatro genótipos o complejos genéticos de cacao: mezcla de clones de los genótipos Criollo, Trinitario, Forastero y granos del cultivar Catongo, de los cuales se tomó una muestra fermentada y otra sin fermentar. Lo anterior se realizó en dos altitudes diferentes sobre el nivel del mar: a 40 msnm (Finca La Lola) y a 600 msnm (Estación Experimental del CATIE en Turrialba). Las muestras se recolectaron entre los meses de junio y setiembre de 1988.

La fermentación se efectuó en cajas Rohan modificadas y, en muy pocos casos, en montones de 70 kg cada uno. Los montones se removían diariamente y la fermentación tardó cinco días, en el sistema Rohan y en montón. El secado, en todos los casos, fue solar.

A estas muestras se les practicaron en el laboratorio del Centro de Investigaciones en Productos Naturales de la Universidad de Costa Rica los siguientes análisis: humedad, peso seco del grano, contenido de grasa, contenido de ceniza, pH, acidez, contenido de N total y N soluble, polifenoles totales, taninos y antocianinas.

El peso se midió con una balanza electrónica marca Mettler H31AR, según lo describen Egbe y Owolalbi (9). La determinación del contenido de humedad se hizo mediante el método descrito en la Norma Ecuatoriana (8). El análisis de grasa se realizó por medio del método de Soxhlet, utilizando hexano como solvente y una extracción a 70°C durante 24 horas. La medición de N total y el pH fue de acuerdo con el método descrito por Williams (1). La acidez se determinó según el método dictado por Barel (2). Para los polifenoles se usó el método de Folin-Denis, descrito por Williams (1). Se hizo una modificación en la preparación de la muestra, pues se tomó 0.2 g de cacao desgrasado y se aforó a 25 ml con metanol al 50 por ciento. Se agitó 5 min y se dejó en reposo una hora. Ese líquido sirvió de muestra, según lo expuesto por Cros, Villeneuve y Vincent (5). Los taninos se analizaron siguiendo el método descrito por Broadhurst y Jones (3). Para ello, se usó como muestra

el extracto preparado para medir los polifenoles. Con el método de Chassevent y d'Ornano (6), se determinaron las antocianinas. Por último, el contenido de cenizas y el porcentaje de nitrógeno soluble fueron evaluados de acuerdo con los métodos mencionados por Lees (12).

Cada análisis se llevó a cabo con una sola repetición y se hicieron seis veces por cada repetición. La fermentación de cada una de las poblaciones genéticas fue un factor limitante, ya que para la fermentación se requieren 70 kg de cacao en "baba", y estas muestras se tomaron de una plantación experimental, donde el número de árboles de cada clon es muy reducido. Por esa razón, no se pudo analizar más de una muestra por población, a pesar de que se hicieron repeticiones para cada lugar y tipo de fermentación, y dos repeticiones para cada población genética.

RESULTADOS Y DISCUSION

Peso seco

No se presentaron diferencias estadísticas significativas entre el cacao cultivado y procesado a 40 msnm y a 600 metros sobre el nivel del mar.

Ceniza, polifenoles totales, taninos y antocianinas

En promedio, el cacao sin fermentar, a 600 msnm (Turrialba), tuvo menor cantidad de ceniza (Fig. 1), de polifenoles totales (Fig. 2), taninos (Fig. 3) y antocianinas (Fig. 4) que el de 40 msnm (La Lola); sin embargo, después de fermentarse retuvo más de los cuatro componentes mencionados que el cacao de la zona baja.

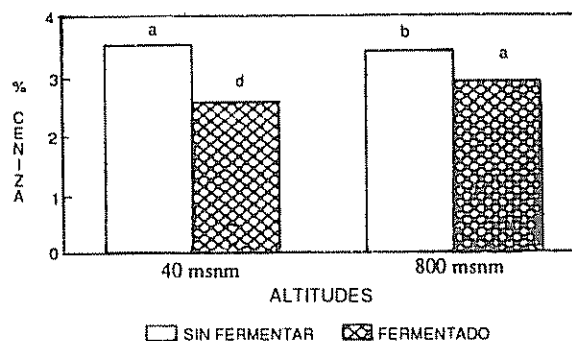


Fig. 1. Efecto de la altitud sobre la fermentación en el porcentaje de cenizas

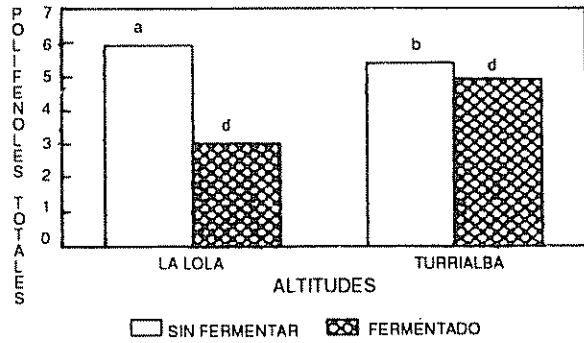


Fig. 2. Efecto de la altitud sobre la fermentación en el porcentaje de polifenoles totales.

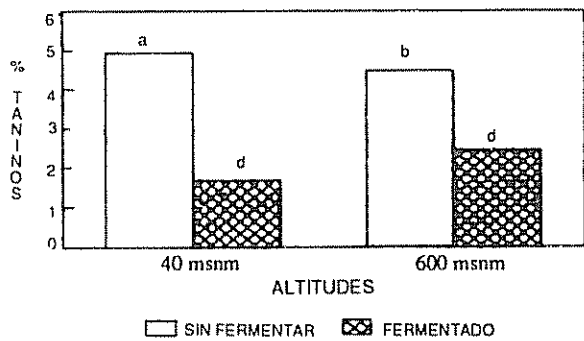


Fig. 3. Efecto de la altitud sobre la fermentación en el porcentaje de taninos condensables.

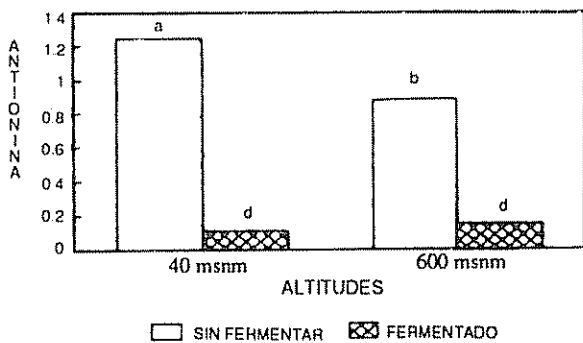


Fig. 4. Efecto de la altitud sobre la fermentación en el contenido de antocianinas (absorbancias).

Este comportamiento fue similar al señalado por Ramírez (16) y Vargas (20), quienes encontraron que en zonas localizadas a una altura de 600 msnm, las temperaturas de fermentación son más bajas que en zonas cercanas al nivel del mar; de manera que la fermentación demora más tiempo. Vargas (20) indicó que en zonas como Turrialba la temperatura inicial es

más baja, por eso tarda más tiempo en alcanzar la temperatura máxima de fermentación, la cual es inferior a la alcanzada en zonas cercanas al nivel del mar, y se mantiene por menos tiempo; eso provoca que las fases del proceso no se desenvuelvan adecuadamente. Las temperaturas máximas se alcanzaron primero al nivel del mar que en zonas cercanas a los 600 msnm; por lo que la muerte del embrión sobrevino más rápidamente en los 40 msnm (18). Esto favoreció que, en forma más temprana, la glicosidasa, la proteasa y, posteriormente, la polifenoloxidasa entraran en contacto con sus sustratos, lo que permitió un mayor tiempo de actividad. Además, en las altitudes cercanas al nivel del mar, la temperatura de fermentación fue más alta que a 600 msnm (16, 17); eso estimuló la actividad de dichas enzimas, cuyas temperaturas óptimas se encuentran entre 45°C y 50°C (11, 13).

Se observa también pérdida de cenizas, polifenoles totales, taninos y antocianinas durante el proceso de fermentación. Esta pérdida fue una consecuencia de la permeabilidad de las células del grano, una vez muerto el embrión, lo que permitió que las cenizas difundieran hacia la testa, diluidas en los líquidos que estaban entrando y saliendo del grano, y que las enzimas se pusieran en contacto con los polifenoles —taninos y antocianinas— para hidrolizarlos, oxidarlos y polimerizarlos.

pH y acidez total

El pH más alto se encontró en el cacao recolectado a 600 msnm, sin fermentar; sin embargo, luego de la fermentación, fue más alto en el cacao de 40 msnm (Fig. 5). La acidez total se determinó menor a 600 msnm cuando el cacao estaba sin fermentar, y no se presentaron diferencias estadísticas significativas después de la fermentación (Fig. 6).

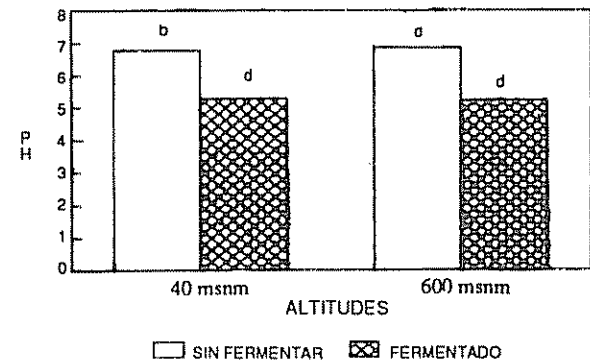


Fig. 5. Efecto de la altitud sobre la fermentación en el pH.

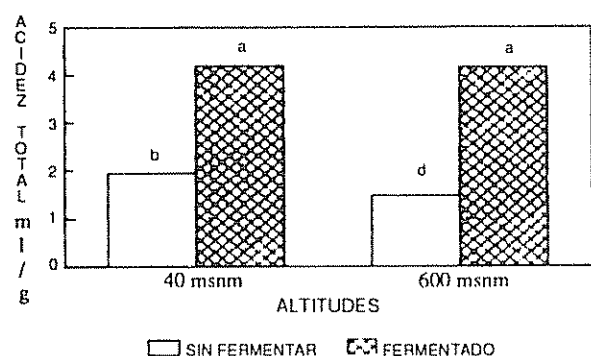


Fig. 6. Efecto de la altitud sobre la fermentación en la acidez total (ml NaOH 0,1M/g cacao)

Se deduce que las diferencias más marcadas, entre el cacao fermentado y el sin fermentar, se presentaron a los 600 msnm, tanto en acidez total como en pH. Esta disminución pudo ser consecuencia de la temperatura de fermentación alcanzada durante el proceso. Vargas (20) y Ramírez (16) informaron que la masa del cacao de Turrialba alcanzó una temperatura menor durante la fermentación, que el proveniente de una finca localizada a una altura semejante a La Lola, como consecuencia de la temperatura ambiente más baja, la cual influye en el inicio de la reacción de oxidación (16). La temperatura de fermentación más alta, que se encontró en estas investigaciones, fue a 40 msnm (La Lola), y se debe a una mayor oxidación de etanol a ácido acético con el correspondiente aumento de concentración de ácido en la pulpa circundante; sin embargo hubo mayor evaporación de ácido acético al medio y oxidación de éste a dióxido de carbono y agua; ese hecho provocó que a 40 msnm hubiera menor ingreso de ácido al cotiledón.

Porcentaje de nitrógeno total

No se presentaron diferencias estadísticas significativas entre el cacao fermentado a 40 msnm y el fermentado a 600 metros sobre el nivel del mar.

Porcentaje de nitrógeno soluble

El cacao fermentado a 40 msnm (La Lola) contenía mayor cantidad de N soluble que el no fermentado (Fig. 7); mientras que el cacao a 600 msnm presentó un comportamiento opuesto. Durante el proceso de beneficiado, el cacao debe sufrir un aumento de N soluble, por lo que se le da una explicación satisfactoria a este comportamiento.

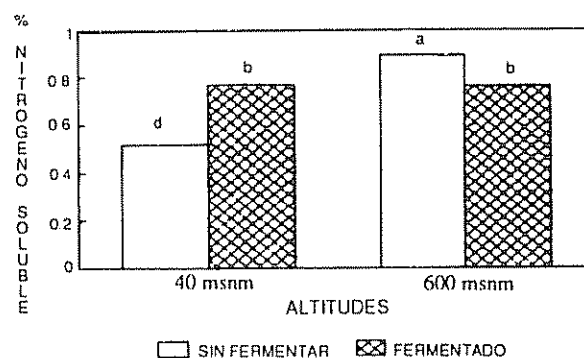


Fig. 7. Efecto de la altitud sobre la fermentación en el porcentaje de nitrógeno soluble.

Se constató que a 40 msnm (La Lola), el cacao perdió más N soluble al fermentarse que a 600 msnm (Turrialba). Este comportamiento fue el esperado, pues —como ya se mencionó— las zonas que se encuentran a una altitud cercana al nivel del mar alcanzan en forma más temprana la temperatura máxima de fermentación, la cual es más alta y se mantiene por más tiempo que en altitudes de 600 msnm (20); con esto se favorece una fermentación más rápida y efectiva, así la hidrólisis de la proteína se produce antes, lo mismo que las reacciones con polifenoles y las exudaciones.

Pocentaje de grasa

Entre ambas altitudes (40 msnm y 600 msnm), el porcentaje de grasa no mostró diferencias estadísticas significativas.

CONCLUSIONES

- Los polifenoles totales, dentro de los cuales están incluidos los taninos y las antocianinas, tienden a acumularse, en mayor proporción, en alturas cercanas al nivel del mar (40 msnm), cuando no se han fermentado; sin embargo, es, en esta zona, donde el cacao sufre las mayores pérdidas de estos compuestos durante la fermentación.
- Los cambios son más pronunciados cuando la fermentación se lleva a cabo al nivel del mar que en zonas con mayor altitud. Por eso es más ventajoso fermentar a altitudes cercanas a los 40 msnm que a los 600 metros sobre el nivel del mar.

LITERATURA CITADA

1. ANALYTICAL METHODS OF AOAC. 1984. 14 ed. S. Williams (Ed.) EE.UU., AOAC p. 187, 199.
2. BAREL, M. 1987. Délai d'écabossage: Influence sur les rendements et la qualité du cacao marchand et du cacao torréfié. *Café, Cacao, Thé* 31(2):141-150.
3. BROADHURST, R.; JONES, W. 1978. Analysis of condensed tanins using acidified vanillin. *Journal of Science and Food Agriculture* 29:778-794.
4. CROS, E.; ROULY, M.; VILLENEUVE, F.; VINCENT, J. 1982. Recherche d'indice de fermentation du cacao. II. Estimation de la matière colorante rouge des fèves de cacao. *Café, Cacao, Thé* 26(2):115-121.
5. CROS, E.; VILLENEUVE, F.; VINCENT, J. C. 1982. Recherche d'indice de fermentation du cacao: Evolution des tanins et des phénols totaux de la fève. *Café, Cacao, Thé* 26(2):109-114.
6. CHASSEVENT, F.; D'ORNANO, M. 1966. La détermination photométrique des pigments du cacao: Essais de la méthode internationale de l'OICC et de quelques variantes. *Café, Cacao, Thé* 10(3):243-266.
7. DIAZ, R. 1989. Características químicas del suelo de la plantación experimental del CATIE en Turrialba. Turrialba, Costa Rica (Comunicación personal).
8. ECUADOR. 1975. Cacao en grano. Determinación de humedad. Ec., Instituto Ecuatoriano de Normalización. 3 p.
9. EDGE, N. E.; OWOLABI, C. A. 1972. Quality of Nigerian commercial cocoa beans. *Turrialba* 22(2):150-155.
10. ENRIQUEZ, G. 1982. La cura o beneficio del cacao: Curso corto. Turrialba, CATIE. 96 p.
11. HARDY, F. 1961. Manual del cacao. Turrialba, IICA. p. 200.
12. LEHRMAN, D.; PATTERSON, G. 1983. Cocoa fermentation. *Biotechnology* 5:529-575.
13. LES, R. 1969. Manual de análisis de alimentos. Zaragoza. Acribia. 231 p.
14. LOPEZ, A. 1986. Chemical changes occurring during the processing of cacao. In *Biotechnology*. P. Dimuck (Ed.) EE.UU., College of Agriculture of Pennsylvania State University. p. 19-53.
15. PARDO, J. 1988. Herencia de la capacidad de fermentación, peso medio de almendra, contenido de testa y porcentaje de grasa en el cacao (*Theobroma cacao* L.). Tesis M. Sc. Universidad de Costa Rica-CATIE. 170 p.
16. RAMIREZ, J. J. 1988. Estudio de la fermentación del cacao (*Theobroma cacao*) mediante cuatro sistemas de fermentación en cuatro zonas cacaoteras de Costa Rica. Tesis Ing. Agr. Turrialba. Universidad de Costa Rica. 142 p.
17. ROMEAU, A. 1980. Acidez libre (pH) em amendoas de cacau da região sul-baiana. Itabuna, Bahía Centro de Pesquisas do Cacau. Informe técnico. p. 241-244.
18. SORIA, J. 1966. Obtención de clones de cacao por el método de selección. *Turrialba* 16(2):119-124.
19. THE COCOA, CHOCOLATE AND CONFECTIONERY ALLIANCE. 1984. Cocoa beans. 3 ed. U.K. 19 p.
20. VARGAS, J. 1988. Comparación de la fermentación de pequeñas cantidades (25, 37,5 y 50 kg), de cacao (*Theobroma cacao*) en tres diferentes altitudes de Costa Rica. Tesis Ing. Agr. Turrialba. Universidad de Costa Rica. 102 p.

General Morphology, Growing Conditions and Development of Fiber Filaments in Lechuguilla (*Agave lecheguilla* Torr.)¹

R.K. Maiti*, M.G. Garza de la Riba*

ABSTRACT

Lechuguilla (*Agave lecheguilla* Torr.) varies in morphological types and abundance under different edaphic conditions. Fiber cells in lechuguilla develop at the base of the developing leaf from procambial cells surrounding an undifferentiated mesophyll. Gradually these procambial cells develop into fiber cells and are transformed into fiber bundles with xylem and phloem on the concave side of the bundle. The sequential processes of the development of fiber cells and fiber bundles are discussed. The fiber bundles are youngest at the leaf base and highly matured at the leaf apex.

Key words : Lechuguilla, morphology, meristem, anatomy, fiber cells, fiber bundles, growth of fiber filament, quality.

COMPENDIO

Se determinó la influencia de diferentes condiciones edáficas sobre la abundancia y tipos morfológicos de lechuguilla (*Agave lecheguilla* Torr.). Las fibras celulares de la lechuguilla se forman en la base de las hojas en desarrollo a partir de las células procambiales que rodean el mesófilo indiferenciado. Estas células procambiales se forman gradualmente en células de fibras y se convierten en un manojo de fibras con xilema y floema en su lado cóncavo. Se discute la secuencia de los procesos en el desarrollo de las células de fibra y de los manojos, los que son menos maduros en la base de la hoja y más maduros en el ápice.

INTRODUCTION

Plant fibers have been used since the beginning of civilization and are obtained from different plant organs, including stems, leaves, seeds or fruits (9). They vary in their mode of development, structure, yield and quality (1, 5, 6, 8, 9, 10). *Yucca* (*Yucca carnerosana*) and lechuguilla (*Agave lecheguilla*) are important commercial fibers and are significant natural resources in the arid regions of Mexico (11, 13). These two species play an important role in the economy of some rural people (11).

Owing to its high bending modulus, resiliency and springiness, lechuguilla fiber is in great demand in many countries for mass production of machine scrubbing brushes (3, 4). Maiti (7) reported that some species of *Agave* (*A. sisalana* and *A. cantala*) could be substituted for *A. lecheguilla* in its utilization in machine scrubbing brushes, provided the fibers are treated with resin. The anatomy of the fiber filaments can be correlated with the quality of the fiber (7, 8, 9). Significant differences were found in morpho-anatomical structures and yield components in *A. lecheguilla* among different localities, and many of the morphological and yield components were well correlated (6, 13). A regression model was able to be formulated for the prediction of fiber yield as a function of different morphological and anatomical variables.

Datta (1) reported that fiber cells in *A. americana* develop from the protophloem as well as from the ground tissue. The present study seeks to explain the general morphology, the developmental anatomy of fiber in *A. lecheguilla*, and to correlate growing conditions and fiber quality.

¹ Received for publication 22 January 1991.

The authors thank the Centro de Investigación, Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León for the facilities afforded for this study, and Fernando Jiménez Guzmán, Facultad de Ciencias Biológicas, for his help in taking the microphotographs. Thanks are also due to Dr. Paul R. Earl for revising the manuscript.

* División de Estudios de Postgrado, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Ciudad Universitaria, Apartado Postal F-16, C.P. 66450, San Nicolás de Los Garza, N.L., Méx.

MATERIALS AND METHODS

Three kinds of leaves were collected for the study of the development of fiber bundles: 1) very young leaves from the central cone, or "cogollo"; 2) partially developed leaves from the middle whorls; and 3) fully mature leaves from the external whorl of the plant.

Transverse sections were made from the three types of leaves at the base, middle and tip with a freezing microtome at $50/\mu\text{m}$. For observation, each $50/\mu\text{m}$ (Alt 230) fresh section was put in 70% alcohol, then transferred to distilled water and mounted on a slide with a drop of glycerine and a drop of safranin (2% in water) with a cover slip.

The fiber filaments were extracted from the basal, middle and tip portions of the developing and mature leaves and then macerated with 10% nitric and 10% chromic acid (1:1) in a test tube at 60°C (2). From four to 24 hours were required for maceration, depending on maturity of the fiber filaments. The macerated fiber filaments from the base, middle and top portions were washed with water, and a fragment of fiber filament was mounted on a slide in 50% glycerine and stained with a drop of safranin or eosin. The development of fiber cells was also studied from serial longitudinal sections.

The fibers were extracted by scraping off the parenchymatous mesophyll tissue with a knife and drying it in an incubator at 60°C for three days. The tension and elongation of fiber strands of five large fiber filaments (obtained from the three regions of the leaf) and five short fiber filaments (from the peripheral regions of each leaf) were measured with a dynamometer (Woodbrand and Co. Ltd., U.S.A.). Fiber quality tests were measured only from the middle portions of each fiber filament.

RESULTS

General morphology and growing condition

A. lecheguilla is a monocarpic plant with a crown of basal leaves at the soil surface emerging from a central cone ("cogollo"). The leaves are lanceolate, tough in texture, and very fibrous, with a bluish or light green leaf surface and marginal curved spines (Fig. 1). The flowers are pedicellate borne in a long inflorescence (Fig. 2).

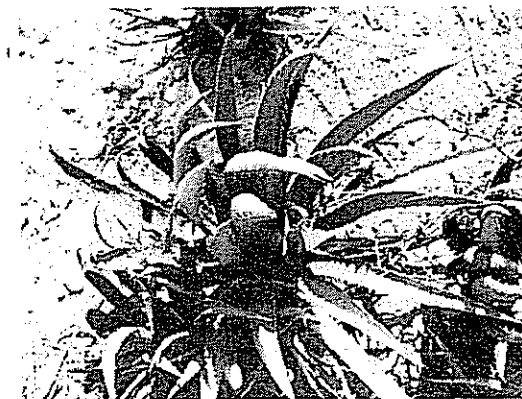


Fig. 1. *A. lecheguilla*, plant with a rosette of basal leaves having marginal spines and central leafy cone; "cogollo" (x 1/3 approx.)

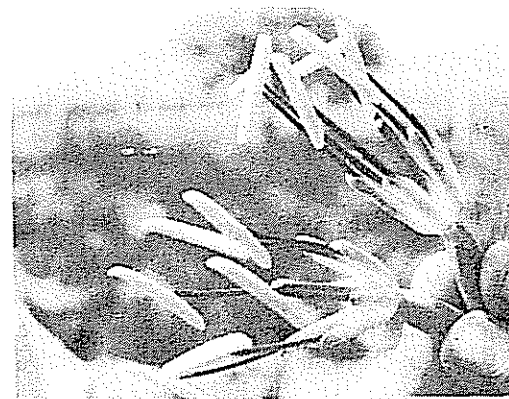


Fig. 2. *A. lecheguilla* flowers with fleshy peduncle, leafy perianth and pendant versatiles anthers (x 2 approx.)

Lecheguilla shows great variability in plant density and morphology under different edaphic conditions and degree of surface inclination in the arid regions of Nuevo Leon. It grows in rocky soils, with population density decreasing with a decrease in pebbles. Morphological types vary in leaf orientations, leaf forms, leaf dimensions, marginal spines and pigmentation.

Developmental anatomy of the fiber bundle

The developmental stages of the fiber strands can be observed from the transverse sections of the developing and mature leaves at three different positions:

base, middle and top of central whorl, and also at the middle whorl and in the peripheral leaves (Figs. 3-14). A transverse section at the actively growing meristematic leaf base of the "cogollo" indicated that the procambial cells first form an incomplete circle of cells with accumulation of dense protoplasm, followed by a complete circle surrounding undifferentiated tissue in the center (Fig. 3). Gradually this takes on a crescent shape with the development of the vascular bundle on the concave side. The inner thin-walled tissue was gradually transformed into fiber cells starting from the concave and progressing to the convex side of crescent (Fig. 3).

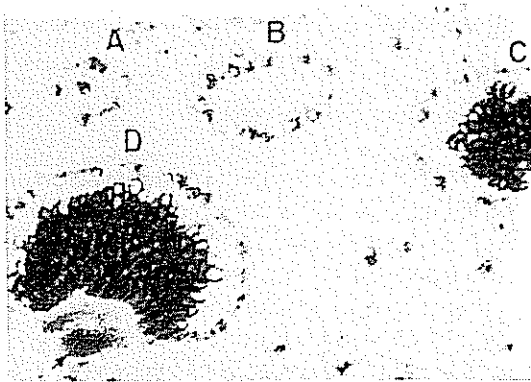


Fig. 3. Transverse section at the base of young leaf from "cogollo" showing (a and b) circles of procambial cells encircling undefined central tissue and (c and d) showing gradual development of fiber cells from the inner convex side of the semilunar fiber bundle x 150.

In a transverse section of the leaf at the base, middle and top portions of the three types of leaves, the fiber cells in the fiber bundles showed a gradual increase in degree of lignification with a broad lumen (Fig. 4), but the middle and apex of the same leaf showed higher degrees of lignification with a narrower lumen (Figs. 5 and 6). Subsequently, the maturing fiber cells in the bundle showed a greater degree of lignification at different positions in the middle and peripheral leaf whorls (Figs. 7 and 8). The fiber cells at the base of the mature leaf of the peripheral whorl were highly lignified (Fig. 9) compared with the same region of younger leaves (Fig. 4).

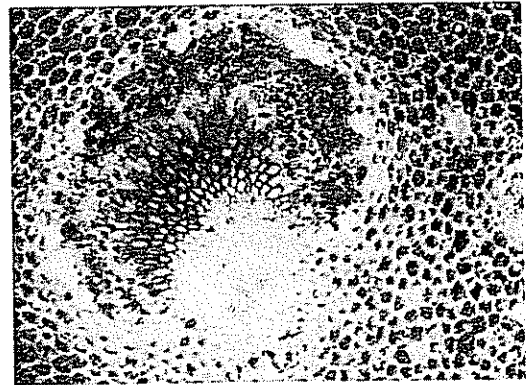


Fig. 4. Transverse section at the base of young leaf showing gradual transformations of thin-walled parenchymatous tissue into a partially lignified fiber bundle (x 600).

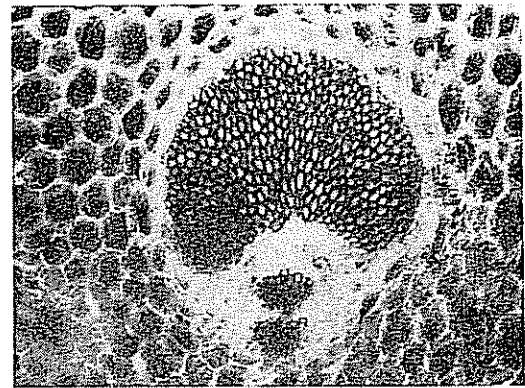


Fig. 5. Transverse section of the young leaf at midregion showing uniform partial lignification of developing fiber cells with broad lumen (x 600).

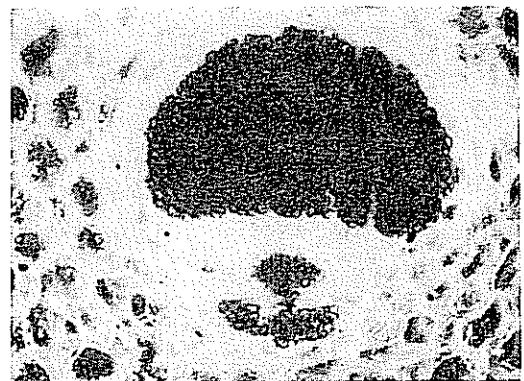


Fig. 6. Transverse section of the young leaf at the apex showing marked lignification of fiber cells and a narrow lumen in the differentiated fiber bundle (x 600).

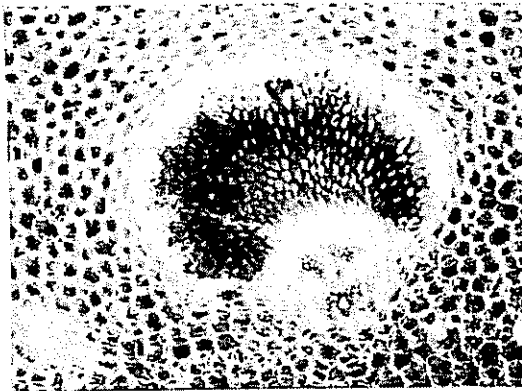


Fig. 7. Transverse section at the base of a partially developed leaf from the middle whorl showing gradual lignification of well-developed fiber cells in the bundle (x 600).

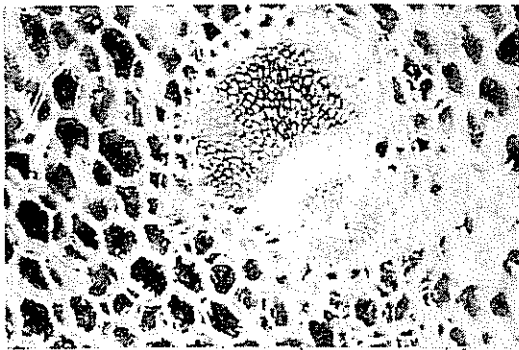


Fig. 8. Transverse section at the midleaf region of the partially developed leaf in the second whorl showing further development of bundle (x 600).

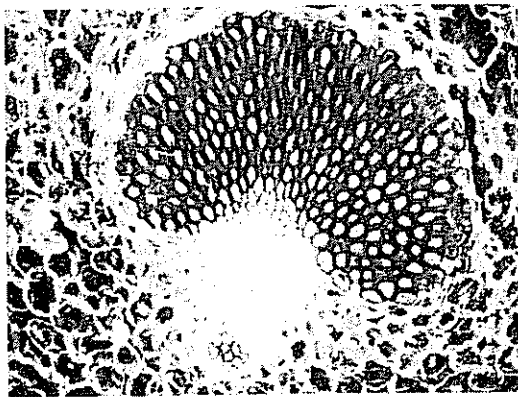


Fig. 9. Transverse section at the base of a mature external leaf showing lignified fiber cells with a broad lumen (x 600).

Owing to the extreme degree of lignification, it was not possible to section the apical spine of the mature leaf. The fiber bundles are at a much younger stage of development in the leaves of the "cogollo" compared with the middle and external leaves, which are highly lignified. Consequently, the fiber strands of the leaf base extend and converge gradually along the growing leaf through mesophyll tissue until they finally unite in the leaf apex to form the strong spine in all the leaves. The filaments at the margin of the leaf are short and do not reach the apex. The initiation of the fiber bundle was associated with the initiation of protophloem and protoxylem in the concave region of fiber bundle.

Subsequently, the development of the fiber bundle was closely associated with the development of the vascular bundle growing from the base to the apex. The highly developed vascular bundle showed organized phloem and xylem having a sheath at the concave side of the large fiber bundle. Differentiation of fibers occurs at two points: one in the protophloem and another in the abaxial xylem.

Development of fiber cells

The fiber initials were developed in the meristem at the leaf base as a result of procambial cell formation associated with denser cytoplasm compared with the surrounding cells. Once formed, the developing fiber initials gradually elongate vertically from the meristematic base with thickening of secondary cell walls along the growing leaves. The lumen showed accumulated granular protoplasm with depositions in the primary cell wall (Fig. 10). Subsequently, the secondary wall thickens into a spiral reticulate pattern (Figs. 11 and 12).

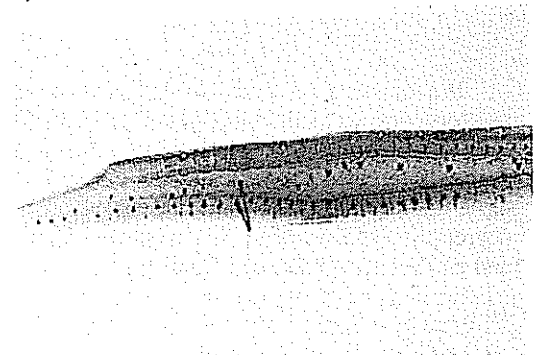


Fig. 10. A developing fiber cell showing depositions of protoplasmic contents on the primary wall in the form of small patches leaving pore spaces in between and accumulation of protoplasmic granules (arrow) (x 1000).

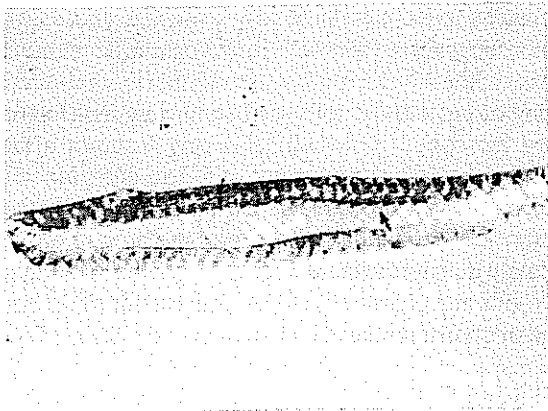


Fig. 11. A developing fiber cell showing accumulation of protoplasmic contents in spiral and reticulate manner (arrow to secondary fiber cell wall) (x 100)

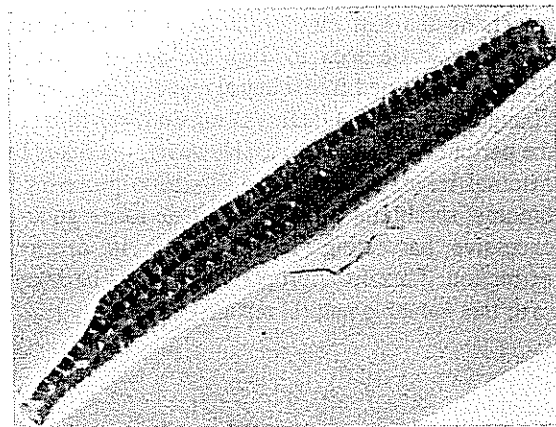


Fig. 12. A contrasting view of a developing fiber cell wall showing protoplasmic granules and depositions of secondary cell wall material in a spiral (x 100)

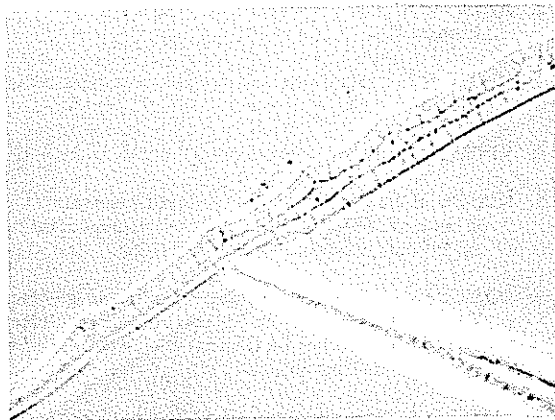


Fig. 13. Fiber cell in the middle part of a young leaf showing broad lumen and irregular constrictions (x 100).

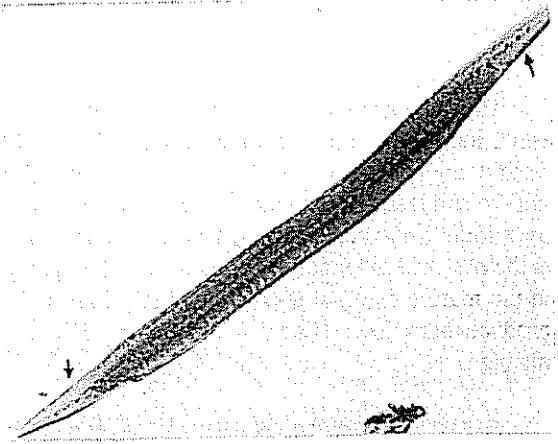


Fig. 14. A maturing fiber cell showing depositions on primary cell wall in small bands leaving pore spaces in between and presence of granules to form the secondary cell wall (x 1000).

The fiber cells in the middle of a leaf have a broad lumen with irregular constrictions (Fig. 13). Sometimes the lumen is narrow with a highly lignified secondary cell wall in the mature leaf (Fig. 14), but with maturation, the cytoplasmic granules disappear from the lumen.

Tension and elongation of fiber filament

The results of the analysis of the physical properties of long central fibers and the short marginal fiber from three types of leaves are shown in Table 1.

Table 1. Physical properties of fiber filaments from three types of leaves (mature, partly developed and young) (average of five filaments).

| Leaf type | Long fiber filament | | Short fiber filament | |
|------------------|---------------------|-----------------|----------------------|-----------------|
| | Tension (cm) | Elongation (cm) | Tension (cm) | Elongation (cm) |
| Young | 2.840 | 3.42 | 1.070 | 1.52 |
| Partly developed | 3.090 | 3.54 | 945 | 1.50 |
| Mature | 2.075 | 1.56 | 799 | 1.22 |

The long central fibers showed higher values of elongation and tension compared with the peripheral short fibers. The fiber quality from younger leaves was superior to that from the mature leaves. As is usual, the quality of long fibers was superior to that of the short ones.

DISCUSSION

The development and lignification of fiber cell walls increases from the base to the tip. The fiber bundles are younger in the central "cogollo" at the base, middle and leaf tips compared with all the positions in the middle whorl and external leaves. They are younger at the base and older at the tip; therefore, the fiber cells in the mature external leaves are highly lignified and produce hard fiber filaments which are difficult to manage.

As shown in the photomicrographs of figures 10 to 14, the secondary cell wall formation is associated with sequentially distinct processes which include the condensation and accumulation of protoplasmic granules and their deposit in the cell wall materials in small patches, both in spiral and reticulate patterns.

The present study supports the findings of Datta (1) for *A. americana*, in that fiber cells in *A. lecheguilla* develop by modification of ground parenchyma at the meristematic leaf base. Thin-walled parenchyma at the leaf base undergoes repeated mitosis with the accumulation of protoplasm to form the fiber initials, which then elongate vertically. The pattern of development resembles that of *A. americana* (1) and Lozano (6 and 13) found that in *A. lecheguilla* there is a gradual accumulation of dense protoplasmic contents and of the protoplasmic micellae in the secondary cell wall.

The fiber strands obtained from the partly mature and younger leaves are of higher quality than those of the mature leaves. The leaves of second whorl might be of equal or of better quality than those of the central core, although the common practice is to exploit the central "cogollo" only.

The fiber quality differs at the base, middle and top of the leaves, as the degree of lignification increases gradually from the leaf base to the tip, and the fiber is softer in the basal regions compared in the distal ones. Owing to high degree of lignification of the fibers obtained from the external mature leaves, these fibers can be used for machine scrubbing brushes and other rustic uses.

CONCLUSIONS

Lechuguilla shows large variability in morphological types and abundance in different edaphic

conditions. The development of fiber cells and fiber bundles in lechuguilla follow sequential processes of morphogenesis. Fiber cells in lechuguilla develop at the base of the developing leaf as a circular to semi-circular ring of procambial cells surrounding an undifferentiated mesophyll. Gradually this ring assumes a lunar shape with the development of xylem and phloem on the concave side. Cells of the inner, undifferentiated meristem accumulate dense protoplasm and are gradually transformed into fiber cells starting at the concave side and progressing to the convex side of the semi-lunar undifferentiated meristematic ring. This is finally transformed into a fiber bundle, followed by vertical elongation of the fiber cells and the condensation of protoplasm, thus forming the secondary cell wall of the fiber cells.

Fiber filaments are formed by the union of developing fiber cell arising from the meristematic leaf base traversing the leaf mesophyll. These fiber filaments converge at the apex to form the apical spine. The filaments obtained from central leaves ("cogollo") are younger and of better quality compared with those from the peripheral mature leaves. However, the fibers from external leaves may be used for rustic purposes like brooms, scrubbing brushes, etc. Due to irregular and excessive harvesting, lechuguilla is in danger of extinction. Therefore, proper care should be taken to save this valuable natural resource.

LITERATURE CITED

1. DATTA, P.C. 1973. Development of leaf fibres of *Agave americana* var. *marginata* Broteria 3:13
2. JOHANSEN, J.A. 1941. Plant microtechnique. New York, Leonard Hill
3. KIRBY, R.H. 1950. Brush-making fibers. Economic Botany 4: 242-252
4. KIRBY, R.H. 1963. Vegetable fibers. London, Leonard Hill.
5. KUNDU, B.C.; SEN, S. 1960. Origin and development of fibres in ramie (*Boehmeria nivea* Gaud.) Proceedings of the National Institute of Science (India) p. 190-268
6. LOZANO, M., E. 1989. Estudio biométrico del *Agave lecheguilla* Torr en 7 localidades de Nuevo Leon. Tesis. Monterrey, N.L., Méx. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo Leon.
7. MATTI, R.K. 1969. Prediction of the quality of jute and some related bast fibres from microscopic study. Textile Digest 30:18, 99-103

8. MAITI, R.K. 1973. Mexican fibres and their possible Indian allies. *Jute Bulletin* 36(7-8):1-6.
9. MAITI, R.K.; CHAKRAVARTY, K. 1977. A comparative study of yield components and quality of common Indian bast fibres. *Economic Botany* 31:55-60.
10. MAITI, R.K. 1979. A study of the microscopic structure of the fiber strands of common Indian bast fibers and its economic implication. *Economic Botany* 33:78-87.
11. MAITI, R.K. 1980. Plant fibres. Dehradun, India, Bishen Singh Mahendra Pal Singh p. 1-490.
12. SHELDON, S. 1980. Ethnobotany of *Agave lecheguilla* and *Yucca carnerosana* in Mexico's Ixtlera zone. *Economic Botany* 34:376-390.
13. VILLARREAL RIVERA, L. 1988. Uso actual y potencial de vegetación de Mina, N.L.: Un estudio biométrico de las fibras vegetales, su desarrollo, estructura y productividad. M. Sc. Thesis. Monterrey, Méx., Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.

Morfologia e Desenvolvimento das Plântulas de *Inga fagifolia* e *I. uruguensis*¹

M.T. Oliveira*, C.M. Beltrati*

ABSTRACT

Seeds of *Inga uruguensis* and *I. fagifolia* were germinated and the development of the seedlings was followed until the first metaphylls were developed. For venation studies, the eophylls and metaphylls were cleared and stained. The germination is semihypogeal. In *I. uruguensis*, eight to twelve successive eophylls, with opposite to alternated filotaxis, and the leaflet number increasing from two to six, were observed. The metaphylls have eight pairs of leaflets. In *I. fagifolia*, 10 to 12 eophylls with two pairs of leaflets were formed, with opposite to alternated filotaxis. The metaphylls have four pairs of leaflets. In both species, all the foliar types, including the petiolar wings, have a pinnate, camptodromous-brochydromous venation pattern.

Palabras-Chave: Plântula, *Inga fagifolia*, *I. uruguensis*, venação.

RESUMO

A germinação das sementes e o desenvolvimento das plântulas de *Inga uruguensis* e *I. fagifolia* foram acompanhados até a produção do primeiro metáfilo. Os eófilos e metáfilos foram diafanizados e corados para estudos de venação. Observou-se que a germinação é semi-hipógea. Em *I. uruguensis* forma-se que a germinação é semi-hipógea, cuja filotaxia passa de oposta a alterna e o número de folíolos cresce de dois até seis, sendo os metáfilos octafoliolados. Em *I. fagifolia*, formam-se dez a doze eófilos bifoliolados, com filotaxia de oposta passando a alterna, seguidos pelos metáfilos tetrafoliolados. Em ambas as espécies, todos os tipos foliares, incluindo-se as alas peciulares, apresentam venação pinada, camptódroma - brochidódroma.

INTRODUÇÃO

O gênero *Inga* (Fabaceae) pertence à tribo Ingeae da subfamília Mimosoideae, sendo exclusivamente neotropical e arborecente. A presença de uma polpa branca, rica em açúcares, em torno da semente é uma característica constante em *Inga* (25), o que confere à semente um padrão estrutural, não encontrado em qualquer outro gênero de Mimosoideae (26).

Considerando-se que a combinação de características da semente e do adulto, representadas na plântula, pode fornecer numerosos indícios para a identificação das espécies no campo e em amostras de sementes (1, 11, 19, 22, 24), realizou-se um estudo morfológico de plântulas, em diversas fases do desenvolvimento, visando principalmente determinar as características morfológicas relevantes para a sua identificação no campo.

Para tanto, foram selecionadas duas espécies, *I. fagifolia* Willd., e *I. uruguensis* Hook. et Arn. que ocorrem com frequência em matas mesófilas semidecíduas e em matas ciliares do Estado de São Paulo, Brasil (3, 5, 20).

MATERIAL E MÉTODOS

O material de *I. uruguensis* e *I. fagifolia* foi coletado em uma reserva de 230 ha de mata mesófila semidecídua situada a cerca de 47°28'W e 22°21'S, no limite entre os municípios de Rio Claro e Araras (Estado de São Paulo, Brasil) e em matas ciliares, no município de Rio Claro. Parte do material coletado foi herborizado e depositado como documento taxonômico no Herbarium Rioclarensense (HRCB), do Instituto de Biociências, UNESP-Rio Claro, sob os números de registro 13.217 a 13.220.

As sementes foram colocadas para germinar em caixas tipo ger-box, sobre papel de filtro umedecido com água destilada. Foram utilizadas amostras de 100 sementes (4 x 25) de cada uma das espécies, mantidas

¹ Recebido para publicação em 30 setembro 1991.
Parte da Dissertação de Mestrado da primeira autora

* Departamento de Botânica, IB/UNESP, Caixa Postal 178, Rio Claro, SP, Brasil - CEP: 13500

em temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1$, em germinador Estufa Incubadora Fanem, mod. 347-G, sob iluminação fluorescente branca contínua (1000 lux). Com 30 dias de idade, as plântulas foram transplantadas para sacos de polietileno de 1 kg, próprios para plantio, contendo mistura (1:1) de terra e areia estéril, umedecida com água de torneira, sendo mantidos em estufa de sombrite 50%, para observação.

Paralelamente, outro lote de 100 sementes foi colocado para germinar diretamente nos sacos de plantio, contendo o mesmo tipo de substrato já citado, sendo mantido também em estufa de sombrite 50%. No primeiro mês, as observações foram feitas diariamente, passando a semanais e, posteriormente, quinzenais. Foram descritos e ilustrados os diferentes estádios de desenvolvimento das plântulas, até o aparecimento das primeiras folhas definitivas (metáfilos), segundo o conceito de Parra (24).

As plântulas obtidas, em diferentes fases de desenvolvimento, foram em parte conservadas em FAA a 50%, para observações posteriores, sendo outra parte herborizada.

Os termos utilizados na descrição das plântulas estão de acordo com Duke (9, 10) e Duke e Polhil (11).

Os desenhos foram realizados a partir de cópias xerográficas das plântulas herborizadas.

Venação de eófilos e metáfilos

Na diafanização de folhas para estudos de venação, foi utilizada a seguinte técnica: as folhas foram coradas em solução a 1% de Fucsina básica em etanol 95% e diafanizadas em solução a 5% de Hidróxido de sódio a 60°C , sendo posteriormente lavadas, desidratadas por passagem em série etílica e montadas em gelatina glicerinada (14). A descrição da venação seguiu a terminologia proposta por Hickey (15, 16). Os desenhos foram obtidos com auxílio de câmara clara, adaptada a estereomicroscópio Wild.

RESULTADOS

I. uruguensis

Tanto em condições controladas (germinador) quanto em condições ambientais (casa de vegetação),

obteve-se 100% de germinação das sementes de *I. uruguensis*. Mesmo dentro dos frutos, foram observadas sementes germinadas (viviparidade).

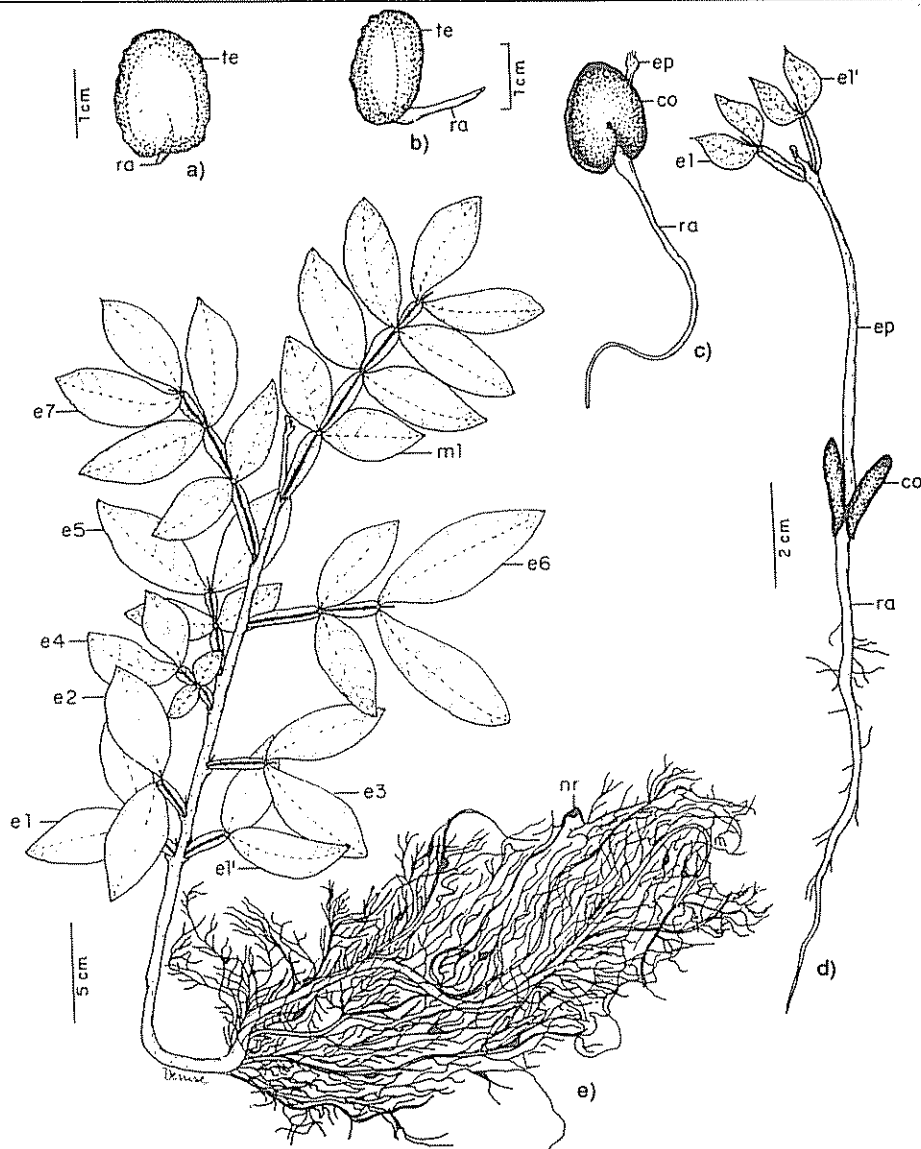
A germinação das sementes inicia-se com o aparecimento da raiz primária (Fig. 1 a b). Esta é branca, do tipo axial, apresentando diversas raízes laterais após a segunda semana (Fig. 1b). O hipocótilo é curto, medindo cerca de 1 cm de comprimento, sendo mais espesso que a raiz e de coloração castanha. Por volta do 9º dia (Fig. 1c), o tegumento se rompe totalmente, libertando os cotilédones, que permanecem ao nível do solo e permitindo o crescimento do epicótilo. Os cotilédones são carnosos e de coloração castanho-esverdeada. O epicótilo é densamente piloso, de coloração semelhante aos cotilédones. Os primeiros eófilos tornam-se visíveis aos 17 dias (Fig. 1c), sendo opostos, compostos e bifoliolados, apresentando inicialmente coloração verde-acobreada, devida ao acúmulo de antocianinas; seus pecíolos são amplamente alados, densamente pilosos, apresentando um nectário arredondado no seu ápice e um par de estípulas filiformes em sua base. Os folíolos dos eófilos são sésseis, havendo uma estípela também filiforme em sua base.

No 24º e 32º dias, pode-se observar, respectivamente, o terceiro e o quarto eófilos, ambos alternos e bifoliolados, semelhantes ao primeiro par descrito.

Por volta do 60º dia de desenvolvimento, já se observavam três a quatro eófilos bifoliolados. Nessa época, surgiram nas raízes os primeiros nódulos de bactérias fixadoras de nitrogênio. A seguir, entre 90 e 160 dias, formaram-se de dois a quatro eófilos alternos e tetrafoliolados. Por volta dos 100 dias, verificou-se a queda dos cotilédones. Em torno de 200 dias, formou-se um eófilo com seis folíolos, sendo que, em algumas plântulas, foram observados dois eófilos desse tipo.

Aos 290 dias (Fig. 1e), observou-se a produção do primeiro metáfilo, que é alterno e apresenta oito folíolos.

As plântulas de *I. uruguensis* apresentaram, portanto, a seguinte sequência de eófilos (Fig. 1e): o primeiro par foi oposto e bifoliolado; a seguir, formaram-se três ou quatro alternos e também bifoliolados; seguiram-se de dois a quatro eófilos alternos tetrafoliolados, um ou dois alternos com seis folíolos e, então, foram formados os metáfilos, que são as folhas características do adulto, alternos e com oito folíolos.



(co = cotilédone; ep = epicótilo; e1/e1' = primeiro par de eófilos opostos; e2-c7 = eófilos alternos; m1 = primeiro metáfilo; nr = nóculo radicular; ra = raiz; te = tegumento)

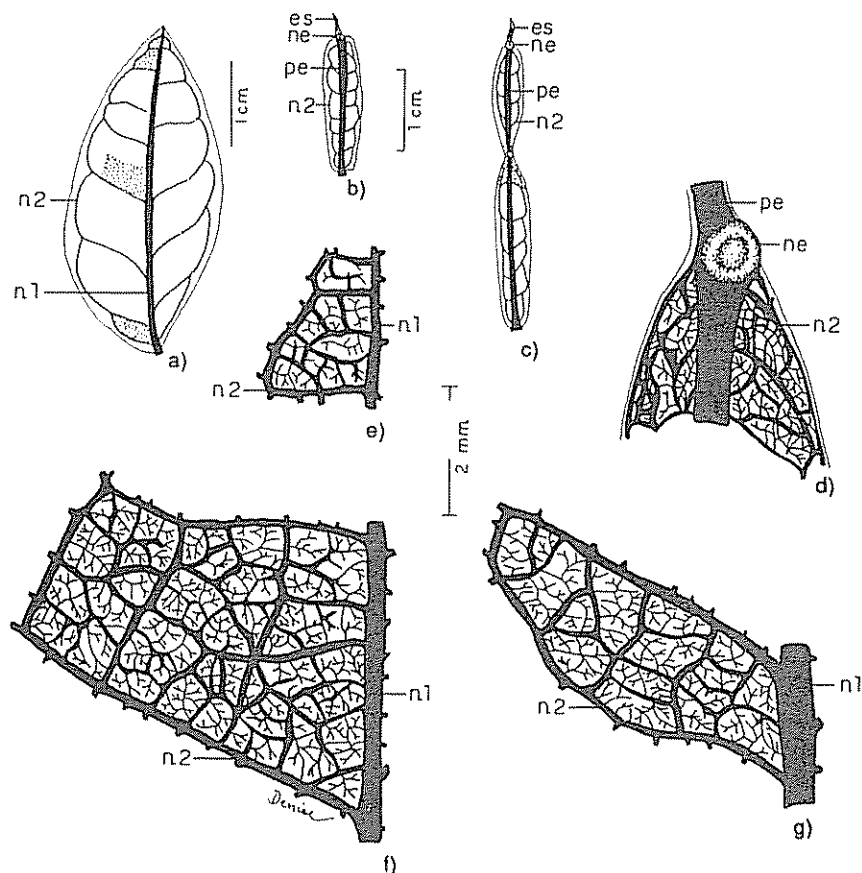
Fig. 1. *Inga uruguensis*: Estádios de desenvolvimento da plântula a) com 1 dia; b) com 5 dias; c) com 9 dias; d) com 17 dias; e) com 290 dias.

Morfologia e padrão de venação dos eófilos e metáfilos. Os primeiros eófilos das plântulas de *I. uruguensis* são opostos, compostos, bifoliolados, com um par de estípulas na base e uma estípula na base dos folíolos. A lâmina foliolar (Fig. 2a) é simétrica, com forma ovada estreita (2:1), ápice agudo e base aguda, assimétrica, normal-cuneiforme. A margem é inteira, a textura membranácea, e a coloração verde-escura.

O pecíolo é alado, apresentando um nectário na base de cada par de folíolos (Fig. 2b, c, d).

A venação é pinada, camptódroma, broquidódroma. A veia primária é fraca (1.05%), de curso reto e não ramificada (Fig. 2).

Nas veias secundárias, o ângulo de divergência é agudo da base até a região mediana, passando a reto no ápice da lâmina. Sua espessura é moderada e seu curso uniformemente curvado em arcos, não sendo ramificadas (Fig. 2). O laço formado pelas veias secundárias encontra a veia superadjacente em ângulo reto, sendo envolvido por arcos terciários e quartenários. As veias intersecundárias são compostas (Fig. 2).



(es = estípela; ne = nectário; n1 = nervura primária; n2 = nervura secundária; pe = pecíolo).

Fig. 2. *Inga uruguensis*. Padrão de venação: Aspecto geral da venação: a) folíolo; b) al a peciolar do eófilo bifoliolado; c) al a peciolar do eófilo tetrafoliolado; d) por menor da al a peciolar, na posição assinalada na Fig. 8; e, f, g) por menores das regiões apical, mediana e basal do folíolo, respectivamente, nas posições assinaladas na Fig. 6.

As veias terciárias formam um ângulo de origem do tipo reto-reto (R-R), com padrão ramificado transverso (Fig. 2e, f, g).

A venação de ordem superior forma um retículo no qual a ordem das veias não é distinta. A venação marginal é em laçada "looped". As vênulas são ramificadas, em geral de uma a três vezes. As aréolas têm desenvolvimento imperfeito, arranjo casual, forma variando de triangular a pentagonal, e tamanho médio (Fig. 2e, f, g).

A venação da ala peciolar é idêntica à dos folíolos (Fig. 2b, c, d).

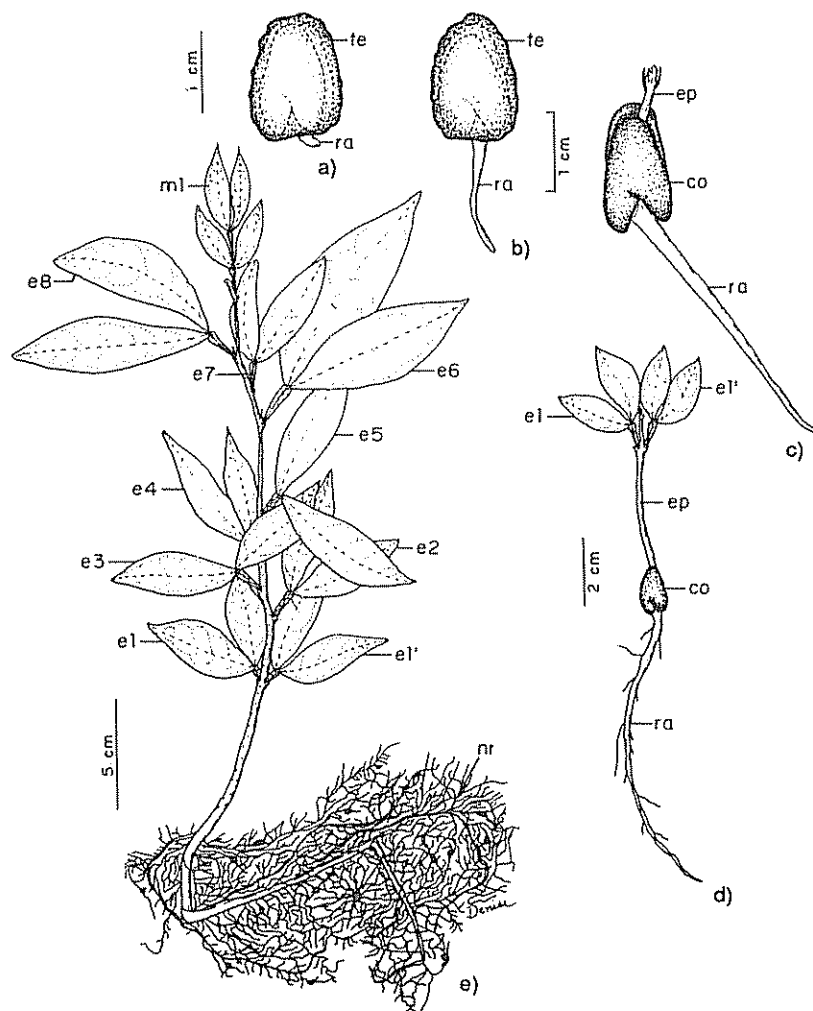
Todos os eófilos e metáfilos repetem esse padrão, considerando-se inclusive as alas peciolares.

I. fagifolia

Também em *I. fagifolia* obteve-se 100% de germinação, nos dois tratamentos, sendo o processo de germinação idêntico ao de *I. uruguensis* (Fig. 3a, b, c). Também foi observada a viviparidade, ou seja, várias sementes foram encontradas germinadas dentro dos frutos.

Sementes poliembriônicas foram observadas e germinaram como as demais, produzindo de duas a quatro plântulas. As plântulas eram semelhantes às obtidas das demais sementes, embora seu tamanho fosse menor e seu desenvolvimento defasado em relação à média para a idade.

O desenvolvimento das plântulas é bastante semelhante ao de *I. uruguensis*, de modo que só serão



(co = cotilédone; ep = epicótilo; e1/e1' = primeiro par de eófilos opostos; e2-e8 = eófilos alternos; m1 = primeiro metáfilo; nr = nódulo radicular; ra = raiz; te = tegumento)

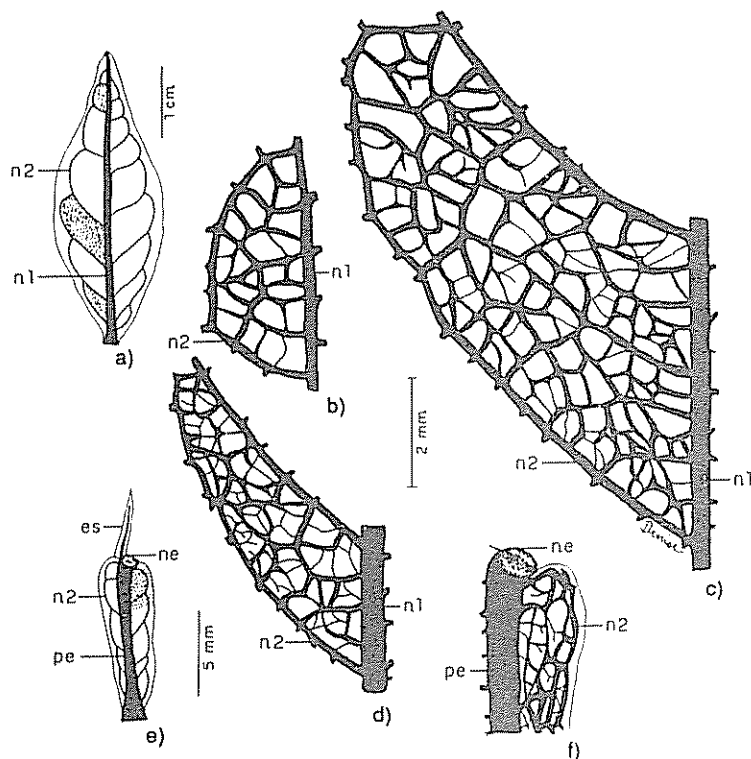
Fig. 3. *Inga fagifolia*. Estádios de desenvolvimento da plântula. a) com 1 dia; b) com 3 dias; c) com 5 dias; d) com 15 dias; e) com 330 dias

detalhadas as diferenças. Toda a plântula tende a ser glabra, mas podem ser vistos pêlos dispersos na plúmula, no epicótilo e nos eófilos. O pecíolo dos eófilos é marginado, ou seja, apresenta uma ala que é muito mais discreta que a encontrada nos pecíolos de *I. uruguensis*.

Aos 15 dias (Fig. 3d), os primeiros eófilos já se encontravam bem desenvolvidos, sendo opostos, bifoliolados e apresentando pecíolos alados com nectário, um par de estípulas em sua base e uma estipela na base dos folíolos. A presença de raízes laterais foi observada a partir do 18º dia, quando se observou também um alongamento do epicótilo. Nas plântulas com 30 dias, os eófilos opostos já haviam atingido seu

tamanho máximo e era possível observar-se o primórdio do primeiro eófilo alterno. Com cerca de 35 dias, observou-se a queda dos cotilédones. Com 40 dias, o eófilo alterno já podia ser descrito, sendo semelhante ao primeiro par, exceto na filotaxia. Após 60 dias, verificou-se a formação dos nódulos radiculares. Por volta do 80º dia, a plântula apresentava três eófilos bem desenvolvidos, sendo dois opostos e o terceiro alterno.

Aos 120 dias, o quarto eófilo (também alterno, bifoliolado) já se encontrava bem desenvolvido.



(es = estípela; ne = nectário; n1 = nervura primária; n2 = nervura secundária; pe = pecíolo)

Fig. 4. *Inga fagifolia*. Padrão de venação. a) aspecto geral da venação do folíolo; b,c,d) pormenores das regiões apical, mediana e basal do folíolo, respectivamente, nas posições assinaladas na Fig. 18; aspecto geral da ala peciolar do cófilo; f) pormenor da ala peciolar, na posição assinalada na Fig. 4c).

Formaram-se então, mais seis a oito eófilos com essas características, sendo observado, aos 330 dias, o primeiro metáfilo, alterno e tetrafoliolados.

Mortologia e padrão de venação dos eófilos e metáfilos

A descrição dos eófilos e metáfilos de *I. fagifolia* é semelhante àquela apresentada para *I. uruguensis*, diferindo nos seguintes aspectos: a forma dos folíolos é ovada lanceolada (Fig. 4a); a veia primária tem seu tamanho classificado como moderado = 1,64% (Fig. 4a); as vênulas ramificam-se apenas uma vez (Fig. 4b, c, d). Os demais aspectos coincidem nas duas espécies, inclusive no que se refere às alas peciulares (Figs. 4e, f, g).

DISCUSSÃO

Conforme se verificou em *I. uruguensis* e *I. fagifolia*, a germinação das sementes de *Inga* é um processo

bastante rápido. Castro e Krug (7) afirmam que essas sementes praticamente não passam por um período de repouso, germinando rapidamente, até mesmo dentro dos frutos, processo também relatado por Camargo (6) para o gênero o verificado no presente trabalho.

A viviparidade, um óbvio exemplo de falta de dormência, tem sido atribuída a algumas espécies tropicais, entre elas muitas espécies de *Inga* (28). Porém, Duke (10) não considera as sementes de *Inga* verdadeiramente vivíparas e, embora haja vários registros de sementes germinadas antes de abscisão dos frutos, o autor afirma que esses casos são mais indícios de condições meteorológicas não usuais do que características inerentes às espécies.

A germinação das sementes de *I. uruguensis* e *I. fagifolia* é do tipo "semi-lipógea" (21, 23, 25, 26), na qual os cotilédones permanecem ao nível do solo. Segundo Duke (9, 10), a germinação das sementes dessa espécie deve ser chamada "criptocotilar", pois a

radícula emerge antes que o tegumento se rompa e libere os cotilédones. Numa terceira classificação, que reúne as características das duas anteriores, a germinação seria chamada "criptogeal" (11), uma vez que os cotilédones permanecem retidos na testa pulposa enquanto ocorre a germinação ("cripto") e, após o rompimento da testa, os cotilédones permanecem ao nível do solo ("geal"). O mais correto, com base nas observações realizadas em *I. uruguensis* e *I. fagifolia*, seria dizer que a germinação é temporariamente criptocotilar ou criptogeal, uma vez que, antes da emergência do epicótilo, verifica-se o desprendimento da testa e os cotilédones apresentam-se livres.

No que se refere ao tipo de germinação, as sementes de *Inga* constituem exceção na subfamília Mimosoideae. Compton (8) e Duke e Polhill (11) são unânimes em afirmar que as plântulas dessa subfamília são fundamentalmente epigeas, havendo algumas espécies com germinação hipógea. No caso em estudo, a germinação das sementes é um exemplo claro de transição entre os dois tipos referidos, sendo dita semi-hipógea.

Com relação ao estudo de plântulas, a primeira dificuldade é definir-se o termo "plântula. De acordo com Font Quer (13), plântula é "o embrião já desenvolvido como consequência da germinação; plantinha recém nascida"; o autor não define, porém, até que fase o termo deve ser utilizado. Por esse motivo, adotou-se a definição de Parra (24) que considera fase de plântula "a que transcorre desde a germinação da semente até o momento em que aparece o primeiro nomófilo com características semelhantes à planta-mãe".

O período juvenil é o maior e mais crítico do ciclo de vida de muitas espécies (11, 18), já que um fracasso dos processos adaptativos nesses estádios poderia levar a espécie à extinção (2). Assim sendo, a embriogênese pode ser considerada como uma fase preparatória para o sucesso da germinação (12).

Além de crítica, a fase de plântula é também pouco conhecida. A capacidade de se reconhecerem, num dado momento, as plântulas e os estados juvenis na mata pode ser de grande valor para se estabelecer a dinâmica de populações da mesma e o manejo silvicultural de muitas matas semelhantes. Além disso, pode servir como índice para reconhecer se trata-se de uma vegetação em estado sucessional ou em clímax, segundo a diversidade de espécies e indivíduos que dominan

o solo (1). A compilação de resultados sobre a velocidade de germinação de sementes, aliados aos de morfologia e desenvolvimento de plântulas, são muito úteis para os envolvidos nos trabalhos com viveiros e pesquisas sobre armazenamento de sementes e regeneração de florestas (22).

Com relação à morfologia das plântulas e aos tipos de germinação, diversos são os autores que utilizam esses caracteres na classificação infragenérica, podendo-se ressaltar: Vassal (29, 30), Robbertse e Schijff (27), Bravo (4), e Parra (24).

Estudos e descrições de plântulas de *Inga* foram realizados por Duke (9, 10), Amo (1), Poncy (25, 26) e Maury-Lechon e Poncy (21). Analisando-se os resultados obtidos para *I. uruguensis* e *I. fagifolia*, conclui-se que os mesmos estão de acordo com os resultados obtidos pelos autores citados para outras 27 espécies do gênero. Em todos esses trabalhos só há registros das fases iniciais do desenvolvimento da plântula, restringindo-se às primeiras folhas. Não são encontradas, portanto, informações a respeito da sequência da formação de eófilos, até o aparecimento dos metáfilos. Para *I. uruguensis* e *I. fagifolia*, essa sequência foi bastante detalhada no presente estudo.

Quanto à classificação da venação, as folhas de *I. uruguensis* e *I. fagifolia* são praticamente idênticas, estando ambas dentro do padrão citado por Hickey e Wolfe (17) para a Ordem Fabales: folhas compostas pinadas, margem inteira, venação pinada, veias secundárias broquidódromas e estípulas presentes.

CONCLUSÕES

As características das plântulas das espécies de *Inga* que se mostraram mais úteis para sua identificação no campo são as seguintes: o tipo de germinação (semi-hipógea), incomum na família Fabaceae, a presença de alas peciolares e de um nectário extra-floral na base de todos os pares de folíolos, o que caracteriza gênero, bem com o padrão sequencial de eófilos, associado à variação de sua filotaxia, que foram bastante diversos nas duas espécies estudadas.

LITERATURA CITADA

1. AMO, S. 1979. Clave para plântulas y estados juveniles de especies primarias de uma Selva Alta Perennifolia em Veracruz, México. *Biotica* 4(2):59-108.
2. AMO-RODRIGUEZ, S., GOMEZ-POMPA, A. 1976. Crescimento de estados juveniles em plantas de Selva Tropical Alta Perennifolia. In *Investigaciones sobre la regeneración de selvas altas en Veracruz, México*. A Gómez Pompa, C. Vasquez-Yanes, S del Amo-Rodríguez, A. Butanda C (Eds.). Méx., Editorial Continental p. 549-565.
3. BENTHAM, G. 1876. Leguminosae III Mimoseae. Flora brasiliensis. Monachii Lipsiae. In C.F.P. Martius (Ed.) v. 15, part 2, p. 459-463, 495.
4. BRAVO, L.D. 1978. Estudio comparativo de las plântulas de las subespecies de *Cassia aphylla* Cav. *Darwiniana* 21:393-399.
5. BURKART, A. 1979. Leguminosae Mimosoideae. In *Flora ilustrada catarinense* P.R. Reitz (Ed.) Itajaí, Herbário Barbosa Rodríguez. p. 48-84.
6. CAMARGO, R. 1950. Sementes de ingazeiros. *Chácaras e Quintais* 81(5):608.
7. CASTRO, Y.G.P.; KRUG, H.P. 1951. Experiências sobre germinação e conservação de sementes de *Inga edulis*: Espécie usada em sombreamento de cafeeiros. *Ciência e Cultura* 3(4):263-264.
8. COMPTON, R.H. 1912. Investigation of the seedling structure in the Leguminosae. *Journal of the Linnean Society of London Botany* 41:1-122.
9. DUKE, J.A. 1965. Keys for the identification of seedlings of some prominent woody species in eight forest types in Puerto Rico. *Annals of the Missouri Botanical Gardens* 52(3):314-350.
10. DUKE, J.A. 1969. On tropical seedlings. I. Seeds, seedlings, systems and systematics. *Annals of the Missouri Botanical Gardens* 56(2):125-161.
11. DUKE, J.A.; POLHILL, R.M. 1981. Seedlings of Leguminosae. In *Advances in legume systematics* R.M. Polhill, P.H. Raven (Eds.) Kew, Crow Copyright p. 941-949.
12. DURE, L.S. 1975. Seed formation. *Annual Review of Plant Physiology* 26:259-278.
13. FONT QUER, P. 1985. *Diccionario de botánica*. Barcelona, Editorial Labor. 1244 p.
14. FUCHS, C.H. 1963. Fuchsin staining with NaOH clearing for lignified elements of whole plants or plants organs. *Stain Technology* 38(3):141-144.
15. HICKEY, L.J. 1973. Classification of the architecture of dicotyledonous leaves. *American Journal of Botany* 60(1):17-33.
16. HICKEY, L.J., WOLFE, J.A. 1975. The bases of Angiosperm phylogeny: Vegetative morphology. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 62(3):538-589.
17. HICKEY, L.J. 1979. A revised classification of the architecture of dicotyledonous leaves. In *Anatomy of dicotyledons*. C.R. Metcalfe, L. Chalk (Eds.). 2. ed. Oxford, Clarendon Press. v. 1, p. 25-39.
18. KOZLOWSKI, T.T. 1971. *Growth and development of trees*. New York, Academic Press. v. 1, 443 p.
19. KUNYOSHI, Y.S. 1983. Morfologia da semente e da germinação de 25 espécies arbóreas de uma floresta com *Araucaria*. Tese M.Sc. Curitiba, Universidade Federal do Paraná. 233 p.
20. MATTOS, J.R. 1983. *Espécies florestais do Rio Grande do Sul*. Porto Alegre, Instituto de Pesquisas de Recursos Naturais Renováveis "AP" no. 13, 44 p.
21. MAURY-LECHON, G., PONCY, O. 1986. Dynamique forestière sur 6 hectares de forêt dense humide de Guyane Française, à partir de quelques espèces de forêt primaire et de cicatrization. *Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle. Serie A Zoologie* 132:211-242.
22. NG, F.S.P. 1973. Germination of fresh seeds of Malaysian trees. *The Malaysian Forester* 36(2):54-65.
23. NG, F.S.P. 1978. Strategies of establishment in Malayan forest trees. In *Tropical trees as living systems*. P.B. Tomlinson, M.H. Zimmermann (Eds.) Cambridge, University Press. p. 129-162.
24. PARRA, P. 1984. Estudio de la morfología externa de plântulas de *Caliandra Gracilis*, *Mimosa albida*, *Mimosa arenosa*, *Mimosa camporum* y *Mimosa tenuiflora*. *Revista de la Facultad de Agronomía (Ven.)* 13(1-4):311-350.
25. PONCY, O. 1984. Graines, germinations et plantules dans le genre *Inga* (Légumineuses, Mimosoideae): Étude morphologique chez quelques espèces de Guyane française. *Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle de Toulouse* 120:35-42.
26. PONCY, O. 1985. Le genre *Inga* (Légumineuses, Mimosoideae) en Guyane Française: Systématique, morphologie des formes juveniles, écologie. *Studies on the flora of the Guianas* no. 13. *Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle. Serie B, Botanique* 31:1-124.
27. ROBBERTSE, P.J., SCHIFF, H.P. VAN DER. 1971. The genus *Acacia* Miller in South Africa, 5 (with special reference to the seedling structure as a taxonomic characteristic). *Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung Muenchen* 10:170-177.
28. VAN DER PIJL, L. 1982. *Principles of dispersal in higher plants*. 3 ed. Berlin, Springer-Verlag. 214 p.
29. VASSAL, J. 1969. Contribution à l'étude de la morphologie des plantules d'*Acacia*: *Acacias africains*. *Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle de Toulouse* 105:55-111.
30. VASSAL, J. 1972. Apport des recherches ontogéniques et sémiologiques à l'étude morphologique, taxonomique et phylogénique du genre *Acacia*. *Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle de Toulouse* 108:125-247.

Effects of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi on the Mixed Cropping of Maize and Beans¹

G. J. M. Gallotti*, L. Zambolim*, Cl. Vieira**

ABSTRACT

A study was carried out under greenhouse condition to determine the effect of four mycorrhizal fungus species (genus *Glomus*), all native of Viçosa, State of Minas Gerais, on beans (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivated alone and in association with maize. The four species had a similar behavior in relation to maize and bean root colonization. When beans were cultivated in association with maize, the four native mycorrhizal species increased their production. No such effect was observed in monocropped beans, because the soil utilized had good fertility. When mycorrhizal root fragments were used as an inoculant, maize was a better host than bean for fungus multiplication. In another study carried out in the field, in which maize was cultivated in association with beans, *Glomus etunicatum* only increased the maize production. The maximum distance reached by this fungus, when spreading through soil, was 50 cm, 64 days after plant emergence.

RESUMO

Em condições de casa de vegetação, foi estudado o efeito de quatro espécies de fungos micorrízicos do gênero *Glomus*, nativas da região de Viçosa, Estado de Minas Gerais, sobre o cultivo consorciado de milho e feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e sobre o monocultivo do feijão. Todas as espécies comportaram-se de modo semelhante ao infectar as raízes das duas culturas. As quatro espécies micorrízicas nativas aumentaram a produção do feijoeiro, quando ele foi cultivado em associação com o milho. Isso não ocorreu quando a leguminosa ficou isolada. O milho mostrou-se melhor hospedeiro para multiplicação de fungos micorrízicos, atuando melhor nas inoculações por intermédio de raízes infectadas. No consórcio milho-feijão, no campo, *Glomus etunicatum* proporcionou aumento de produção apenas do milho. Esta espécie de fungo dispersou-se pelo solo, até a distância máxima de 50 cm, no período de 64 dias após a emergência das plantas.

INTRODUCTION

Interplanting maize (*Zea mays*) and common bean (*P. vulgaris*) is a common practice among small farmers in Minas Gerais and other Brazilian states. It is well known that both crops, when planted alone, have a growth response when inoculated with vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi. However, no information was found in the literature on the effects of mycorrhizal fungi on maize and beans when grown together. The purpose of this study was to investigate such effects.

MATERIALS AND METHODS

Five species of VAN fungi of the genus *Glomus* were tested. Four, identified here as *Glomus* 1, *Glomus* 2 (both collected from bean rootlets in the field), *Glomus* 3, and *Glomus* 4 (collected from maize rootlets, in the field) are native to the Viçosa area. The fifth species, *G. etunicatum* Becker & Gerd., was introduced from the University of Florida.

The bean cultivar Milionário 1732 and the maize cultivar Cargill 111 were used in this study.

First experiment

The experiment was carried out under greenhouse conditions, in pots containing 3 kg of clay soil previously passed through a 5 mm mesh sieve and then treated with methyl bromide (100 cm³/m³). Prior to planting, the pots were fertilized with triple superphosphate (150 ppm of P) and potassium chloride (80 ppm of K) and the soil pH corrected to 6.0 with dolomitic limestone. Seven days after plant emergence, a micronutrient

¹ Received for publication 12 September 1991.

* Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, 36570; Viçosa, MG, Brasil

** Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa

solution containing H_3BO_3 (1.86 g/l), $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (5.28 g/l), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (7.04 g/l), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (2.09 g/l), $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ (0.09 g/l), $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (3.01 g/l) was applied at a rate of 8 ml per pot. Thirty days after plant emergence, urea (30 ppm of N) was applied as top-dressing on pots containing only bean plants. However, on pots with maize and maize-bean mixture, urea was added 30, 40, and 50 days after plant emergence, at the rate of 30 ppm of N per application.

The experimental design was a 4 x 2 x 2 factorial with 4 VAM fungal treatments (*Glomus* 1, *Glomus* 2, *Glomus* 3, and *Glomus* 4), two cultural treatments (maize and bean in the same pot versus separate pots), and two inoculation treatments (inoculated versus uninoculated pots). Each inoculated pot received 1000 spores placed 7 cm below the surface. Five replicate pots were used for each treatment. Two to three seeds were planted per pot, and subsequently thinned to one plant five days after emergence. The pots containing the cereal-legume mixture were thinned to one plant of each species. To evaluate infection incidence, an auger was used to collect root samples down to 10 cm at 30 and 60 days after emergence. Root colonization was estimated according to the method of Giovannetti and Mosse (5) using 10% KOH cleared roots stained with 0.1% lactophenol trypan blue (15). Root segments were considered colonized if either hyphae, arbuscules, vesicles, or spores were visible. Seed productions were determined only for beans.

Second experiment

This experiment was performed under greenhouse conditions and its objective was to evaluate the infection incidence using infected root fragments as the inoculum. To obtain the inoculation material, maize roots previously inoculated with *Glomus* 3 or *Glomus* 4 were collected 30 and 60 days after plant emergence. The roots were washed, cut into small pieces and placed 7 cm below the soil surface in pots containing 3 kg of soil previously treated with methyl bromide and fertilized as in the first experiment. Afterward, two to three bean seeds were planted in each pot and later thinned to one plant.

The same procedure was employed for bean roots inoculated with *Glomus* 1 and *Glomus* 2. They were washed, cut into small pieces and placed in pots where maize was planted. Each of the eight treatments was replicated five times. Infection was evaluated 45 days after plant emergence.

In the first and second experiments, powdery mildew (*Erysiphe polygoni* DC ex Merat) and tropical mites (*Polyphagotarsonemus latus* (Banks)) attacked the bean plants. Effective control was achieved with Dinocap (0.5 g/l) applied 25 and 35 days after plant emergence.

Third experiment

This experiment was carried out under field conditions. The soil was inoculated with 20 000 spores per meter of *G. etunicatum* applied at a depth of seven centimeters. To distribute the spores evenly throughout the furrow, the inoculum was first mixed with soil (250 ml/m).

The experimental design was a randomized complete block with three planting treatments: maize and beans interplanted in the same row, maize and beans in separate rows 50 cm apart. There were two inoculation treatments, inoculated and uninoculated furrows, for each planting treatment. Each experimental unit was 1 m in length and replicated four times.

Only the rows containing maize were inoculated with VAM fungus. Plots were overseeded and hand-thinned to five maize or 14 bean plants per meter for the single-crop rows and five maize plus 14 beans per meter for the mixed-croprows.

The soil was treated with methyl bromide (100 cm^3/m^3). The plots were fertilized with urea, triple superphosphate, and potassium chloride at a rate of 60 (N) - 160 (P_2O_5) - 90 (K_2O) kg/ha. The fertilizer was broadcasted over the plots and incorporated into the soil by harrowing. Thirty days after plant emergence, 30 kg/ha of N (ammonium sulfate) was applied as top-dressing. To avoid water stress, plots were irrigated to 10% of yield capacity.

For root colonization evaluation, samples were taken with an auger 15 cm below the soil surface at 34, 49 and 64 days after plant emergence. When maize and beans were planted in the same row, two root samples were taken per plot, at a distance of 3 cm from the inoculation point. When the crops were planted in separated rows, four samples were taken per plot, two at 3 cm from the inoculation point and two at 3 cm from the bean stems.

A final sampling was performed at 78 days after plant emergence, at 10, 20, 30, and 40 cm from the inoculation point. For yield determination, 3 maize

plants and 14 bean plants per plot were harvested and weighted.

RESULTS AND DISCUSSION

First experiment

Table 1 shows bean yields for the 16 treatment combinations. The effects of inoculation and cultural methods were both significant at the 0.01 level. The interaction of cultural method x VAM species was also significant, at the 0.05 level. Yields were significantly higher in the pots containing only beans. This is likely due to the competitive effects of maize, which can reduce yields of an interplanted crop 50% to 70% (17).

Table 1. Effect of native species of *Glomus* on yield of beans planted alone or jointly with maize.

| VAN fungi species | Cultural method | Inoculation | Yield (g) | Yield increase (%) |
|-------------------|-----------------|--------------|-----------|--------------------|
| <i>Glomus 1</i> | Only bean | Inoculated | 10.48 | + 10.6 |
| | | Uninoculated | 9.48 | |
| | Bean + Maize | Inoculated | 5.08 | + 62.8 |
| | | Uninoculated | 3.12 | |
| <i>Glomus 2</i> | Only bean | Inoculated | 11.10 | + 11.9 |
| | | Uninoculated | 9.92 | |
| | Bean + Maize | Inoculated | 3.50 | + 16.7 |
| | | Uninoculated | 3.00 | |
| <i>Glomus 3</i> | Only Bean | Inoculated | 9.60 | + 1.0 |
| | | Uninoculated | 9.50 | |
| | Bean + Maize | Inoculated | 4.18 | + 16.1 |
| | | Uninoculated | 3.60 | |
| <i>Glomus 4</i> | Only Bean | Inoculated | 11.54 | - 1.4 |
| | | Uninoculated | 11.70 | |
| | Bean + Maize | Inoculated | 4.22 | + 27.9 |
| | | Uninoculated | 3.30 | |

When grown alone, bean yield was about 10% higher in the presence of *Glomus 1* and *Glomus 2*, the species collected from bean rootlets at the field. *Glomus 3* and *Glomus 4*, the species collected from maize rootlets, had no effect on bean yield.

When beans were associated with maize in the same pot, inoculation significantly increased bean yield

across all native species of *Glomus*. Therefore, when bean and maize were grown together and both colonized with VAN fungi, the competitive ability of the legume was enhanced. It seems that, under conditions of competition for P and other elements uptake from the soil, as occurs in associated cropping, mycorrhizal fungi can improve the yield ability of legumes.

It is likely that the four *Glomus* species would promote yield increases of the bean cultivated alone, if the soil available P content had been lower. Ross (16) has observed, in *Glomus* inoculated soybeans, yield increases of 122%, 67% and 12%, when the level of the applied P was low, medium and high, respectively. The high P content of the soil (107 ppm) probably did not permit the full expression of VAM fungi potential.

In this experiment, maize yield was not measured and only percentage of colonized root was determined. Initially, only small differences in colonization incidence occurred among the mycorrhizal species, *Glomus 1* and *Glomus 2* presented an average of 36% colonization in maize, 36 days after plant emergence. *Glomus 3* and *Glomus 4* presented an average of 29% colonization incidence higher than 95%. In beans, 30 days after emergence the average colonization incidence was 33%, with *Glomus 1* and *Glomus 2*, and 24% with *Glomus 3* and *Glomus 4*; but 60 days after emergence, it was higher than 97%. When both plants were grown together, *Glomus 1* and *Glomus 2* caused an average colonization incidence of 34%, while *Glomus 3* and *Glomus 4* caused 31%, 30 days after plant emergence; however, 60 days after emergence, the colonization incidence surpassed 95% for the four species.

Second experiment

Results on mycorrhizal fungi spread from one crop to another are on Table 2. Infected roots of both bean and maize were able to transmit the mycorrhizal fungi to the other species. When cultivated over bean roots infected with *Glomus 1* and 2, the average infection incidence on maize roots reached 73.6%. This was practically twice as much (37.9%) as that found in bean roots grown over maize roots infected with *Glomus 3* and 4. The difference occurred in spite of the similar infection percentages of both crops roots used as inoculum. This demonstrated that maize is a better host than beans for mycorrhizal fungi multiplication.

When maize colonization is well established and bean colonization is initiated, a nutrient transfer from

maize to bean plant can be expected, at least initially. Hypha interconnections between roots of the same or different plant species had already been proved to take place (7, 8).

Table 2. Mycorrhizal colonization incidence of maize and bean at 45 days, grown in pots inoculated with *Glomus* species from bean and maize roots

| Crop | Inoculation source | Mycorrhizal species ^{1/} | Days after plant emergence ^{2/} | Colonization incidence at 45 days (%) |
|-------|--------------------|-----------------------------------|--|---------------------------------------|
| Maize | Bean roots | <i>Glomus</i> 1 | 30 | 72.3 |
| | | | 60 | 87.6 |
| | Maize roots | <i>Glomus</i> 2 | 30 | 63.0 |
| | | | 60 | 71.4 |
| Bean | Maize roots | <i>Glomus</i> 3 | 30 | 34.9 |
| | | | <i>Glomus</i> 4 | 30 |
| | | | 60 | 42.9 |

1/ *Glomus* 1 and 2 were isolated from bean roots; *Glomus* 3 and 4 were isolated from maize roots.

2/ When inoculated roots used as inoculum were collected

In the field, bean plants can benefit from hypha interconnections if planted within 10 cm from the maize plants. According to Whittingham and Read (21), nutrient transfer among plants is, ecologically, a very important phenomenon, since young plant survival depends upon such transfer when they grow among well-established plants that exploit the available nutrients intensively. The access, through hyphae of VAM fungi, to phosphorus reserves from neighbor plants is, therefore, of considerable benefit to plants at the initial stage of growth.

In the Zona de Mata area, State of Minas Gerais, the yield of dry season beans, when in relay cropping with maize, is sometimes higher than the yield of beans alone, when rains are scarce (18). It is likely that this benefit from associated cropping can be explained, at least in part, by the effect of VAM fungi that develop at maize roots and quickly pass to young bean roots. In this way, bean roots would be quickly colonized by mycorrhizal fungi, improving P and water absorption.

Third experiment

Results for second experiment (Table 3) show the percentages of root colonization. The rows containing maize all had similar results: at 34 days after plant

emergence, colonization was already high (> 40%). Colonization percentage in beans planted 25 cm from inoculated maize had a low colonization percentage, even at 64 days after emergence. The colonization percentage when beans were 50 cm from the inoculated maize was even lower: less than 2% colonization in bean rootlets at 64 days after plant emergence. Those results demonstrated that *G. etunicatum* will have little effect on bean plants when the inoculum is 25 to 50 cm away. At this distance, the colonization index was very low and, in addition, the colonization took place when bean plants had already passed the critical growth stage (60 days after planting) when mycorrhizal fungi are important.

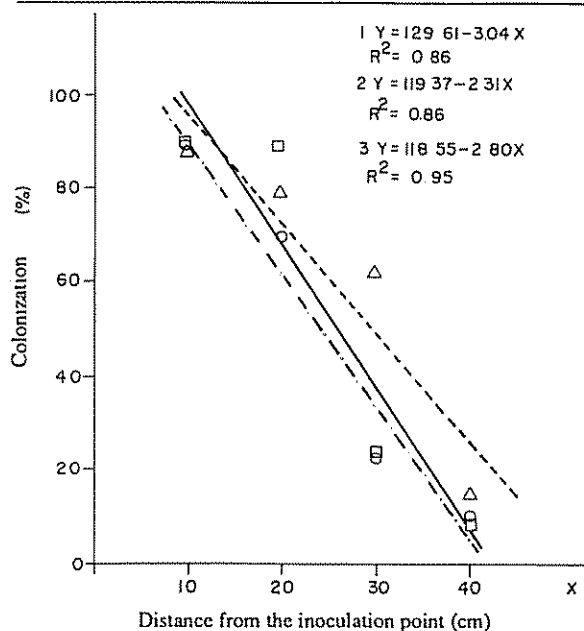
Table 3. *G. etunicatum* percentage colonization of maize and bean roots.

| Treatments | Crops | Days after plant emergence | | |
|--|------------------------------|----------------------------|------|------|
| | | 34 | 49 | 64 |
| Maize with beans in the same row, inoculated ^{1/} | Maize and bean ^{2/} | 45.3 | 79.4 | 99.4 |
| Inoculated maize with bean 25 cm distant | Maize | 42.0 | 76.3 | 99.4 |
| | Bean | 0.0 | 5.9 | 8.7 |
| Inoculated maize with bean 50 cm distant | Maize | 47.1 | 89.0 | 99.5 |
| | Bean | 0.0 | 0.0 | 1.6 |

1/ 20 000 spores per meter of row

2/ Mixed maize and bean roots.

The movement of *G. etunicatum* from the inoculation point at 78 days after plant emergence is shown in Figure 1. When beans were planted jointly with maize, colonization rates at the distances of 10 and 20 cm from the inoculation point were similar, but decreased considerably at distances greater than 20 cm. When beans were planted 25 cm away from the inoculated maize, colonization at the distance of 30 cm from the inoculation point was higher than in the other two bean plant arrangements. It is likely that this occurred because, at that distance, bean root number, and consequently root volume, was very high; therefore, a better condition for VAM development would be present. When beans were planted 50 cm distant from the inoculated maize, the colonization rate was the lowest.



- 1 □ maize and beans in the same row
 2 Δ maize and beans in different rows at a 25 cm interval.
 3 ○ maize and beans in different rows at a 50 cm interval.

Fig. 1 *G. etunicatum* spread in three bean-plant arrangements in association with inoculated maize, 78 days after plant emergence

It was found, therefore, that colonization rates at different distances from the inoculated maize varied according to bean plant arrangements, but were almost the same at 40 cm from the inoculation point. Warner and Mosse (19) found that for *Trifolium repens* and *Festuca rubra*, in sole croppings, root density is important for *G. fasciculatum* spread, but the species effect was much more important. In *T. repens*, a greater root density was favorable for fungus colonization, which did not occur in *F. rubra*.

According to results presented by several authors, spread of mycorrhizal fungi in the soil is highly variable, depending on the interaction between soil-plant-fungus. Reports of mycorrhizal spread from the inoculation point vary from as little as 5 cm after 15 weeks (19) to distances greater than 4.5 m after 15 weeks (12).

The difference in the ability of mycorrhizal fungi to spread can also be attributed to their capacity to reach, through their external hyphae, different distances from the root surface. There are reports that those fungi can spread both small distances from the root surface (20) and long distances, up to 16 cm (23).

In this study, *G. etunicatum* spread through soil at a maximum distance of 25 and 50 cm, 49 and 64 days after plant emergence, respectively; this can be attributed to the influence of irrigation water. The study was carried out during the dry season and thus daily irrigations (with sprinklers) were necessary. According to Mosee *et al.* (12), the transfer of a small amount of soil carrying VAM fungi spores by wind, rain, and irrigation water cannot be excluded under field conditions. McIlveen and Cole (11) also attribute to soil movement the dissemination of mycorrhizal fungi in the field.

Maize yields were significantly higher at the 0.05 level for the inoculated treatments versus uninoculated treatments across all planting treatments (Table 4). Inoculation with VAM fungus resulted in a 19-21% yield increase for the maize in mixed cropping. As widely reported (2, 3, 4, 6, 9, 10, 13), mycorrhizal association is advantageous for maize, but all the mentioned studies were carried out with maize in monoculture.

Table 4. Maize yield with and without inoculation with *G. etunicatum*, in different types of association with beans.

| Treatments | | Yield (g) | Production Increase caused by inoculation (%) |
|---------------------------------|--------------------------|----------------------|---|
| Maize and beans in the same row | Inoculated ^{1/} | 708.00 ^{2/} | 21.08 |
| | Uninoculated | 584.75 | |
| Maize with beans 25 cm distant | Inoculated ^{1/} | 769.53 ^{2/} | 19.44 |
| | Uninoculated | 644.25 | |
| Maize with beans 50 cm distant | Inoculated ^{1/} | 707.75 ^{2/} | 19.45 |
| | Uninoculated | 592.50 | |

1/ 20 000 spores per meter of row

2/ Indicates significant difference at the 0.05 level between the inoculated and uninoculated treatments.

Table 5. Bean yield when planted in the same row with maize, inoculated or not with *G. etunicatum*.

| | Yield ^{1/} (g) | Yield increase due to inoculation (%) |
|--------------|-------------------------|---------------------------------------|
| Inoculated | 74.2 | 2.48 |
| Uninoculated | 72.4 | |

1/ 14 plants per plot. The yield difference is not significant at 0.05 level (t test)

Bean yield (Table 5) was determined only for the planting treatment with maize and beans in the same row. Although it has been reported that *G. etunicatum* is effective for increasing bean growth and yield (22), this study, with beans interplanted with maize, showed no significant effect of fungal inoculation. Parada (14) mentions that any alteration in the soil-fungus-plant system can modify the relationship among them. The presence of maize roots near the bean roots may have affected the mycorrhizal fungus-bean root interaction. Another possible reason for the ineffectiveness of fungal inoculation of bean plants is that the maize plant density was too high. The recommended plant population for mixed cropping of maize and beans should not exceed 40 000 maize plants per hectare. Denser populations are disadvantageous for bean yield, because maize is a competitive plant (1, 17). In this study, the maize density was 5 plants per meter or 50 000 per hectare. It is likely, therefore, that the maize competition nullified any beneficial effect of *G. etunicatum* on the bean growth and yield, since the roots of the latter crop presented a high percentage of colonization by the fungus. In addition, the bean plants were not subjected to water stress and low P fertilization, two conditions that favor VAM fungi effect.

CONCLUSIONS

1. Native mycorrhizal species had a similar behavior in relation to maize and bean root colonization, but the species *Glomus* 1 and *Glomus* 2 were slightly more aggressive for both crops.
2. When beans were cultivated in association with maize, the four native mycorrhizal species increased their production; however, no such effect was observed on monocropped beans, because the soil used had adequate fertilization.
3. When mycorrhizal root fragments were used as inoculant, maize was a better host than bean for the VAM fungus multiplication.
4. *G. etunicatum* was effective in increasing maize yield across all planting treatments, but not effective in increasing bean yields.
5. Maximum distance reached by *G. etunicatum*, when spreading through soil, was 25 and 50 cm from the inoculation point, 49 and 64 days after plant emergence, respectively.

LITERATURE CITED

1. ARAUJO, G.A. DE A.; SILVA, C.C. DA; VIEIRA, C.; CHAGAS, J.M. 1983. Cultura associada de feijão e milho. VI. Efeito do espaçamento entre covas de milho. *Revista Ceres* 30:394-397.
2. DAFT, M.J.; HOGARTH, B.G. 1983. Competitive interactions amongst four species of *Glomus* on maize and onion. *Transactions of the British Mycological Society* 80:339-345.
3. GERDMANN, J.W. 1964. The effect of mycorrhiza on the growth of maize. *Mycologia* 56:342-349.
4. GERDMANN, J.W. 1965. Vesicular-arbuscular mycorrhizal formed on maize and tulip tree by *Endogone fasciculata*. *Mycologia* 57:562-575.
5. GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist* 84:489-500.
6. HALL, I.R. 1978. Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizas on two varieties of maize and one sweet corn. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 21:517-519.
7. HEAP, A.J.; NEWMAN, E.I. 1980. Links between roots by hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *New Phytologist* 85:169-171.
8. HIRREL, M.A.; GERDMANN, J.W. 1979. Carbon transfer between onions infected with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist* 83:731-738.
9. ISLAM, R.; AYANABA, A. 1981. Growth and yield responses of cowpea and maize inoculation with *Glomus mosseae* in sterilized soil under field conditions. *Plant and Soil* 63:505-510.
10. JACKSON, N.E.; FRANKLIN, R.F.; MILLER, R.H. 1972. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizae on growth and phosphorus content of three agronomic crops. *Soil Science Society of America Proceedings* 36:64-67.
11. MCILVENN, W.D.; COLE JUNIOR, H. 1976. Spore dispersal of Endogonaceae by worms, ants, wasps and birds. *Canadian Journal of Botany* 54:1486-1489.
12. MOSSE, B.; WARNER, A.; CLARKE, C.A. 1982. Plant growth response to vesicular-arbuscular mycorrhiza. XIII. Spread of an introduced VA Endophyta in the field and growth effects of inoculation in the second year. *New Phytologist* 90:521-528.
13. MURDOCH, C.L.; JACKOBS, J.A.; GERDMANN, J.W. 1967. Utilization of phosphorus sources of different availability by mycorrhizal and non-mycorrhizal maize. *Plant and Soil* 27:329-334.
14. PARADA, A. 1984. Efeito de fósforo e de micorriza vesicular-arbuscular no feijoeiro. Master's thesis. ESALQ, Piracicaba. 138 p.
15. PHILIPS, J.M.; HAYMAN, D.S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55:158-161.

16. ROSS, J.P. 1971. Effect of phosphate fertilization on yield of mycorrhizal and non-mycorrhizal soybeans. *Phytopathology* 61:1400-1403
17. VIEIRA, C. 1978. Cultivo consorciado de milho com feijão. *Informe Agropecuário* 10(118):13-19.
18. VIEIRA, C. 1985. O feijão em cultivos consorciados. *Imprensa Universitária da U.F.V., Viçosa*. 134 p
19. WARNER, A.; MOSSE, B. 1982. Factors affecting the spread of vesicular mycorrhizal fungi in soil. I. Root density. *New Phytologist* 90:529-536.
20. WARNER, A.; MOSSE, B. 1983. Spread of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi between separate roots systems. *Transactions of the British Mycological Society* 80:353-380.
21. WHITTINGHAN, J.; READ, D.J. 1982. Vesicular-arbuscular mycorrhiza in natural vegetation systems. III. Nutrient transfer between plants with mycorrhizal interconnection. *New Phytologist* 90:277-284.
22. ZAMBOLIM, L.; OLIVEIRA, A.R.; RIBEIRO, A.C. 1985. Efeito da infecção por fungos micorrízicos do tipo vesicular-arbuscular sobre o desenvolvimento do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Ceres* 32:252-258.
23. ZAMBOLIM, L.; SIQUEIRA, J.O. 1985. Importância do potencial das associações micorrízicas para a agricultura. EPAMIG, Belo Horizonte. Série Documentos no. 26. 36 p.

Determinación de la Variación Isoenzimática en Progenies de *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees.¹

N. Guzmán*, M. Di Renzo*, M. Poverene**

ABSTRACT

The knowledge of the reproductive biology of a species is important for genetic improvements. In lovegrasses, cultivars are apomictic and sexuality is not frequent. Having shown that 'Kromdraai' presents certain variability within cultivars, it is necessary to establish whether this is due to clone mixtures or the existence of sexual reproduction. The objective of this work is to determine the existence of isozymatic variation in progenies of the 'Kromdraai' cultivar. The existence of isozyme variation in 13 progenies were examined using electrophoretic techniques and the revelation of esterase and peroxidase enzymes. It observed that most of the progenies, about 20 plants, did not present variation in the electrophoretic patterns. In four progenies variations in the isoenzymatic patterns were observed. With these results, it is possible to infer that the 'Kromdraai' cultivar is composed of facultative apomictic genotypes.

Key words: Polymorphism, isozyme, apomixis, sexuality, lovegrasses, *Eragrostis curvula*.

COMPENDIO

El conocimiento de la biología reproductiva de una especie es importante para su mejoramiento genético. En pasto llorón, la mayor parte de los cultivares son apomicticos y la sexualidad es poco frecuente. Habiéndose demostrado que el cultivar Kromdraai presenta cierta variabilidad intracultivar, se plantea la necesidad de conocer si la misma se debe a una mezcla de clones, o si existe reproducción sexual. El objetivo de este trabajo es determinar la existencia de variación isoenzimática en progenies correspondientes al cultivar Kromdraai. Se analizaron 13 progenies de Kromdraai utilizando técnicas de electroforesis y revelado de las enzimas: esterases y peroxidasas. Se observó que la gran mayoría de las progenies representadas por unas veinte plantas, no presentaron variación en los patrones electroforéticos. En cuatro progenies se produjeron variantes en los patrones isoenzimáticos. Con estos resultados, es posible inferir que el cultivar Kromdraai está compuesto por genótipos apomicticos facultativos.

Palabras claves: Polimorfismos isoenzimáticos, apomixis, sexualidad, pasto llorón (*Eragrostis curvula*).

INTRODUCCION

Eragrostis curvula (Schrad.) Nees, llamado vulgarmente pasto llorón, es una gramínea perenne, de clima templado cálido, originaria de las regiones central y meridional de Africa. En Argentina, se cultiva en áreas subhúmedas y semiáridas, y cubre una superficie de 700 000 ha, principal-

mente en la región pampeana. Asimismo, se calcula en más de cinco millones de hectáreas la superficie del país apta para su cultivo (4). Sus principales cualidades son: rusticidad, longevidad y capacidad para consolidar suelos aerosionables; por lo que es un recurso forrajero de extraordinario valor.

Existen numerosas variedades botánicas de pasto llorón, y tipos intermedios entre ellas, de los que se han seleccionado los cultivares comerciales (6).

Como en muchas gramíneas forrajeras, la opomixis es el modo de reproducción predominante. La mayor parte de los cultivares son poliploides apomicticos, en los cuales la sexualidad es poco frecuente. Esta modalidad reproductiva provoca que la progenie de una planta sea de constitución genética idéntica; por eso, los distintos cultivares de esta gramínea son notablemente uniformes.

¹ Recibido para publicación el 3 de enero de 1991.

* Facultad de Agronomía y Veterinaria, UNRC, E.P. núm 9, 5800 Rfo Cuarto, Arg.

** Departamento de Agronomía, UNS, 8000 Bahía Blanca, Arg.

El mecanismo apomítico es diplosoria seguida de pseudogamia (11).

El descubrimiento de sexualidad y apomixis facultativa (13, 14, 15) abrió una nueva perspectiva para el mejoramiento genético mediante la hibridación, que permite combinar cualidades de las distintas variedades botánicas (16). La sexualidad se detecta por la existencia de variabilidad en la descendencia, ya sea de caracteres morfológicos en pruebas de progenie, o por medio de análisis citológicos de desarrollo del saco embrionario. Brix (1) utilizó ambos métodos para analizar la variación presentada por el cultivar Kromdraai, la que se asoció con apomixis facultativa.

Smith (9) demostró variación isoenzimática en progenies de *Panicum maximum*, una gramínea apomítica facultativa. La electroforesis de isoenzimas es una técnica, rápida y sencilla, para la detección de variabilidad en progenies, las cuales pueden ser analizadas en un estadio precoz. En pasto llorón, esta técnica ha permitido caracterizar cultivares mediante patrones isoenzimáticos, y cuantificar la variabilidad existente dentro de ellos (5, 7, 8). Uno de los cultivares con mayor variación isoenzimática fue Kromdraai, pues no puede ser asignado a una variedad botánica en particular. El origen de la variabilidad podría ser la reproducción sexual, como lo señalado por Brix (1), o consistir en una mezcla de clones apomíticos. El análisis de plantas individuales permitiría caracterizar el modo de reproducción de este cultivar. En caso de tratarse de genotipos apomíticos, sus progenies presentarían el mismo patrón isoenzimático. Los genotipos con reproducción sexual mostrarían descendientes con patrones isoenzimáticos polimórficos.

El objetivo de este trabajo fue determinar la existencia de variación isoenzimática en progenies del cv. Kromdraai, para identificar genotipos con reproducción sexual o apomíticos facultativos. Estos genotipos podrían incluirse en esquemas de hibridación y, así, contribuir al mejoramiento del pasto llorón.

MATERIALES Y METODOS

El material utilizado consistió en 13 progenies del cultivar Kromdraai representadas cada una por 20 plantas. La semilla se obtuvo de la primera cosecha de la población original del cultivar Kromdraai. La siembra fue realizada en macetas mantenidas en invernáculo. El corte se realizó desde que la planta presentó de tres a cuatro hojas, hasta su completo desarrollo. Se cortó

una sección foliar de 10 cm de largo, y se maceró en un mortero con 150 µl de buffer utilizado para hacer el gel, más 20 mg de arena. El extracto obtenido se absorbió en trozos de papel Whatman núm. 3 (6 x 7 mm); que provenía de una toalla de papel con el fin de evitar el material particulado.

El gel se preparó, en una cámara de 12 cm x 18 cm x 0.6 cm, utilizando almidón hidrolizado sigma (lote 98 F 0.045) al 12%, más 220 ml de buffer adecuado, según el sistema gel-electrodo empleado.

Los extractos se sometieron a la electroforesis para separar las enzimas peroxidadas (PER) y esterasas (EST).

Se utilizaron los siguientes sistemas de buffer gel-electrodos (10): *sistema I* (buffer del gel: 15 mM tris-cítrico pH 7.8; buffer de electrodos 0.3 M borato de sodio pH 8.6); *sistema II* (buffer del gel: 65 mM histidina-cítrico pH 5.7; buffer de electrodos: 9 mM histidina-cítrico pH 5,7. Los extractos foliares de las isoenzimas de PER fueron separados por el sistema I, y las EST, con el sistema II.

En ambos sistemas los extractos absorbidos en papel Whatman se sembraron en ranuras practicadas a 4.5 m (Sistema I) y a 6.5 cm (Sistema II) del borde catódico del gel.

En todas las corridas electroforéticas se sembraron 18 muestras y un testigo. Se aplicó una corriente de 20 mA durante 3:50 h (Sistema I) y 16 mA en 3:30 h (Sistema II), manteniendo el gel refrigerado. La corrida se concluyó, cuando el frente avanzó 9 cm desde la línea de siembra.

El revelado de las isoenzimas se efectuó con técnicas estandarizadas: EST. (EC. 3.1.1.), (12): 100 ml de buffer 0.1 M tris-ClH pH 6.0, más 5 mg de Fast Garnet GBC, con el agregado de 25 mg de alfa naftil acetato, disuelto en 1 ml de agua destilada. El gel se incubó a 37°C en la oscuridad durante 3 h PER (EC.11.1.7.), (10): 10 ml de buffer 0.1 ml de acetato de sodio pH 4.5, más el agregado de 28 mg de 3-amino-9 etilcarbazol disueltos en 2 ml de dimetilformamida. El gel se reveló a temperatura ambiente agregándose en el momento peróxido de hidrógeno al 3 por ciento.

Los criterios los fenotipos isoenzimáticos fueron la presencia o ausencia de bandas, la distancia migracional, y la coloración fijada en tres intensidades: fuerte, intermedia, y débil.

RESULTADOS

Con la aplicación de los sistemas electroforéticos I y II, se obtuvo una buena resolución de bandas de peroxidadas, así como, distintos patrones de bandeado (Fig. 1 y 2). Las esterases presentaron mayor nitidez mediante el sistema I.

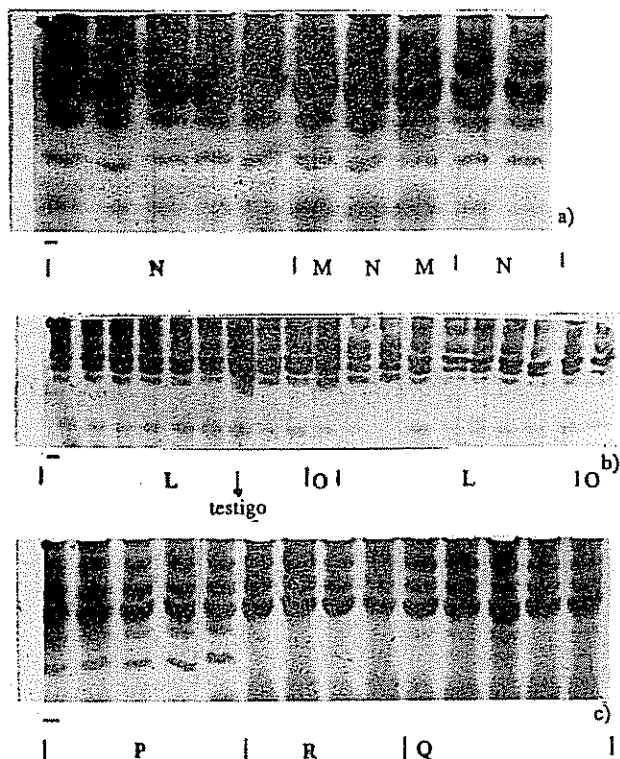


Fig. 1. Patrones de isoenzimas de peroxidadas, obtenidas con el Sistema I: a) progenie 1 mostrando dos fenotipos distintos; b) progenie 10 con dos fenotipos diferentes, la muestra 7 pertenece al testigo; c) progenie 7 con tres fenotipos distintos.

Con la utilización de un testigo, se manifestaron diferencias en la intensidad de coloración entre las distintas corridas. Estas diferencias se observaron de manera más acentuada en la zona "B" de esterases, mientras que la zona "A" presentó una coloración más estable (Fig. 3).

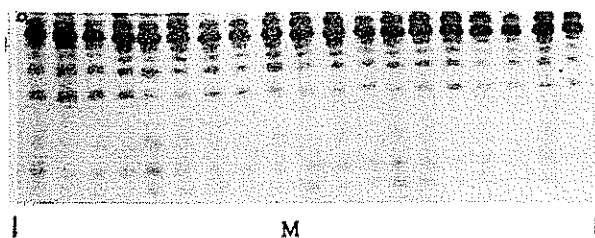


Fig. 2. Patrones de isoenzimas de peroxidadas, obtenidas con el Sistema II; las muestras pertenecen a la progenie 2

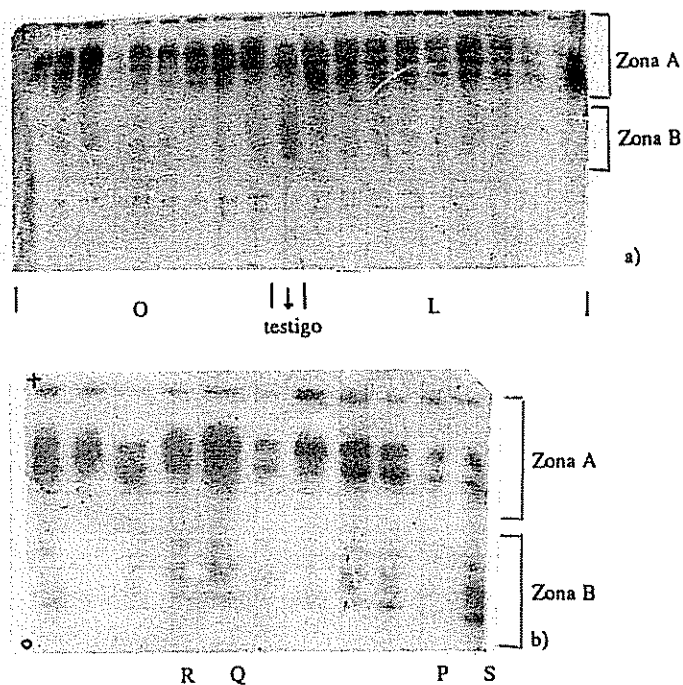


Fig. 3 Patrones de isoenzimas de esterases: a) las nueve primeras muestras corresponden a la progenie 10, la muestra diez corresponde al testigo y las restantes a la 9; b) muestras correspondientes a la progenie 2

De las plantas analizadas, se consiguieron 12 fenotipos isoenzimáticos diferentes en esterases, y 15 distintos en peroxidadas (Cuadro 1). A los fenotipos isoenzimáticos resultantes, se les asignó una letra mayúscula y a las bandas una letra minúscula.

Cuadro 1. Fenotipos isoenzimáticos en progenies de pasto llorón.

| Progenies | Núm. de plantas | Fenotipos de EST | Núm. de plantas | | Fenotipos de PER | |
|-----------|-----------------|------------------|-----------------|-----------|------------------|------------|
| | | | Sistema I | Sistema I | Sistema I | Sistema II |
| 1 | 20 | N | 20 | MN | M | |
| 2 | 20 | P Q R S | 20 | N | M | |
| 3 | 20 | M | 20 | M | M | |
| 4 | 20 | W | 20 | M | M | |
| 5 | 20 | U | 20 | L | N | |
| 6 | 20 | I | 20 | L | Q | |
| 7 | 20 | O | 20 | P Q R | P | |
| 8 | 20 | U | 20 | T | M | |
| 9 | 20 | L | 20 | U | O | |
| 10 | 20 | O | 20 | L O | N | |
| 11 | 20 | O | 20 | P | L | |
| 12 | 20 | Z | 20 | S | L | |
| 13 | 20 | P | 20 | T | L | |
| Testigo | 1 | X | 1 | Z | M | |

Las esterasas presentaron actividad en la región anódica. El número de las bandas varió de 4 a 11 por zimograma. Se distinguieron dos zonas: una "B" lenta, y otra "A" rápida (Figs. 3a y 3b). En la zona "A", se visualizó la mayor diferencia entre los distintos patrones

debido a la existencia, o no, de determinadas bandas, y la variación del número (de 2 a 6 bandas). La zona "B" resultó ser más constante en el número y en la posición de las bandas, excepto en seis zimogramas (patrones L, O, Z, T, W de la Fig. 4).

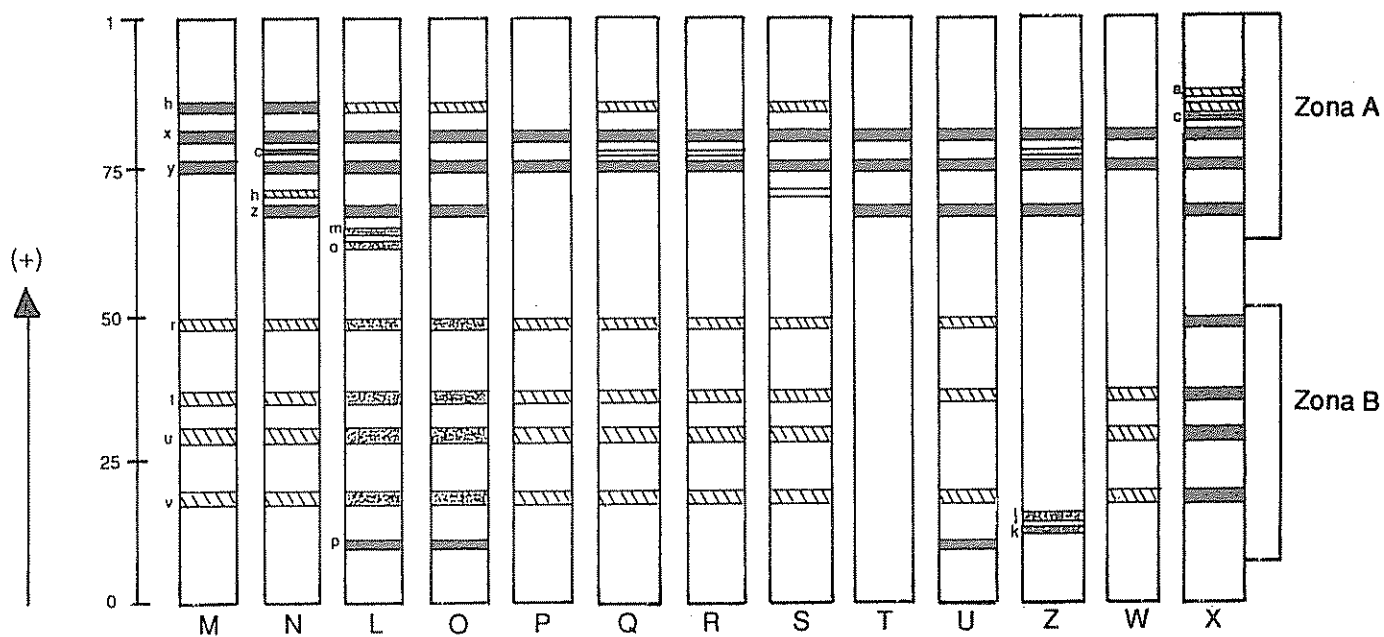


Fig. 4 Patrones isoenzimáticos de esterasas. Intensidad del coloreado de las bandas: fuerte, intermedio y débil.

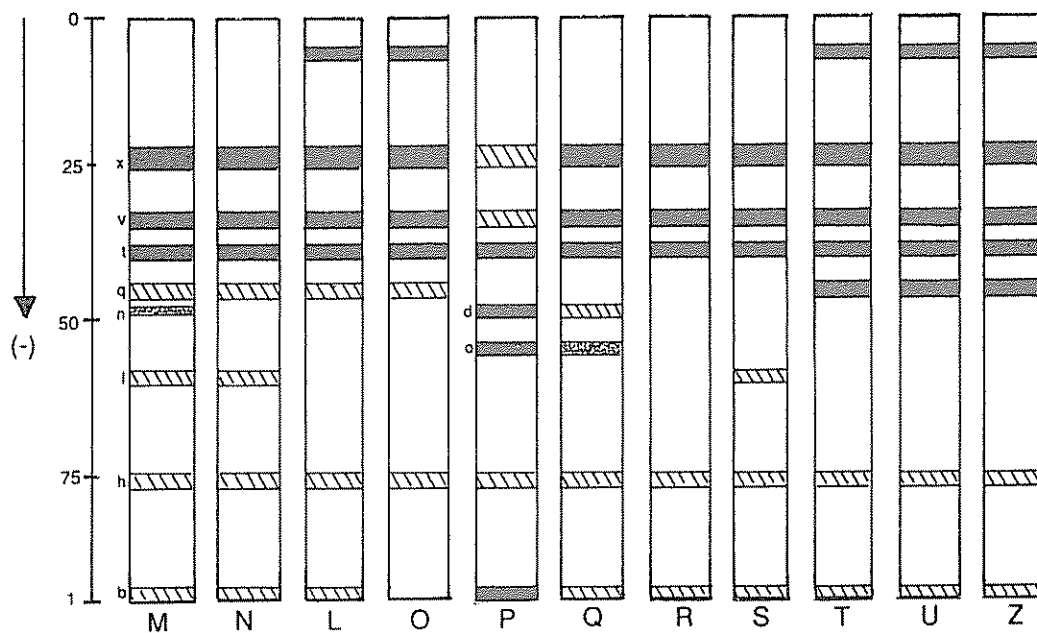


Fig. 5 Patrones isoenzimáticos de peroxidasas con el Sistema I. Intensidad del coloreado de las bandas: fuerte, intermedio y débil.

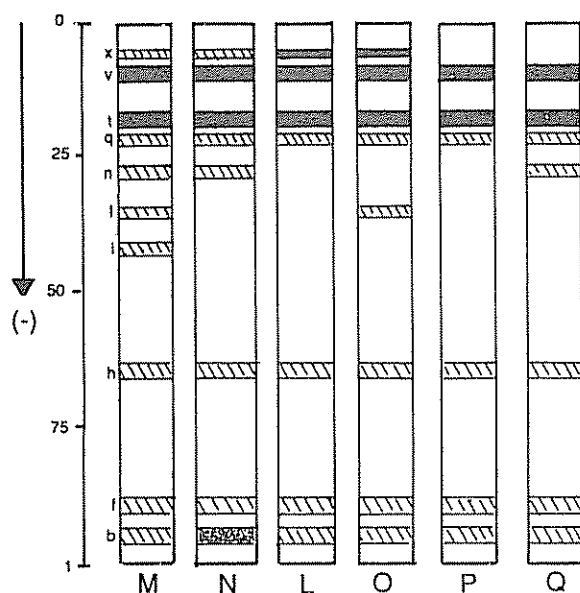


Fig. 6 Patrones isoenzimáticos de peroxididas con el sistema II. Intensidad del coloreado de las bandas: fuerte, intermedio, débil.

Las peroxididas presentaron actividad en la región catódica. Se obtuvieron 10 patrones isoenzimáticos con el sistema I (Fig. 5) y con el II (Fig. 6), y el número de bandas varió de 5 a 8 por zimograma respectivamente.

De las 13 progenies analizadas, la gran mayoría presentó fenotipos isoenzimáticos de peroxididas y esterases, como se observa en la Fig. 3a. Una proporción menor de las progenies analizadas mostró patrones con variación (Cuadro 1). La progenie 2 presentó cuatro zimogramas diferentes en esterases (Fig. 3b); la progenie 7, tres patrones distintos en peroxididas (Fig. 1c); y las progenies 1 y 10, dos zimogramas diferentes, cada una en peroxididas (Fig. 1a y 1b).

DISCUSION

Las pruebas de progenies realizadas para determinar variabilidad mediante caracteres isoenzimáticos permitieron observar, usando un testigo y la repetición de las muestras, la invariabilidad de los distintos patrones durante la experiencia. Esto muestra la escasa influencia del ambiente sobre las isoenzimas (2), de manera diferente ocurre con las características morfológicas, pues Smith (9) observó que los caracteres isoenzimáti-

cos establecen más diferencias entre las progenies que los morfológicos, por lo que son muy buenos marcadores.

El análisis de las plantas, dentro de cada una de las progenies del cultivar Kromdraai, muestra una apreciable variabilidad en la expresión de las isoenzimas: peroxididas y esterases. Esta variabilidad isoenzimática corrobora la variación existente en Kromdraai, evaluada por medio de caracteres morfológicos y citológicos (1), que indican diverso grado de variabilidad fenotípica y tres tipos de saco embionario en distintas proporciones.

Las plantas de las progenies, generalmente, resultan uniformes, pero en ocasiones aparecen variantes. Esta aparición, en forma ocasional, concuerda con lo señalado por Smith (9) en las pruebas de progenies realizadas en *Panicum maximum* Jacq.

La variación, que se observa dentro de las progenies, pondría de manifiesto la existencia de sexualidad (9). De acuerdo con el polimorfismo isoenzimático hallado en el análisis de las 13 progenies, la mayor parte del cv. Kromdraai estaría compuesto por genotipos apomíticos, y una menor proporción de genotipos con reproducción sexual. Si el número de las plantas analizadas hubiera sido mayor, es posible que hubiesen aparecido más fenotipos isoenzimáticos distintos dentro de las progenies, ya que la sexualidad ocurre en forma esporádica.

Este resultado permitió identificar y seleccionar plantas madres, que producen progenies variables y, además fuera de tipo de esas progenies. Aunque 'Kromdraai' no es un cultivar muy difundido, se ha observado algunas plantas de muy buena productividad y calidad entre las progenies segregantes. Estas plantas seleccionadas podrán ser utilizadas en futuros programas de mejoramiento genético o para continuar con estudios básicos.

CONCLUSIONES

- El cultivar Kromdraai posee cierto grado de sexualidad, por lo que es en efecto, un apomítico facultativo, aunque su reproducción es más frecuente agámica.
- El análisis de isoenzimas por electroforesis constituye una técnica adecuada para detectar y cuantificar

el grado de sexualidad en este cultivar, y, por consiguiente, en otros de comportamiento similar.

- Las ventajas que presenta el análisis isoenzimático son: a) posibilidad de analizar progenies en un estadio precoz, así como, en avanzados; b) permite analizar gran número de descendientes en corto tiempo; c) alta repetibilidad de los resultados, debido a la escasa influencia ambiental sobre el zimotipo; d) complementa, adecuadamente, el registro de observaciones morfológicas en pruebas de progenic.

LITERATURA CITADA

1. BRIX, K. 1974. Sexual reproduction in *Eragrostis curvula* (Schr.) Nees. Z. Pflanzenzuchtg 71:25-32.
2. BROWN, A.H.D.; WEIR, B.S. 1983. Detection and measurement of natural selection. In Isozymes in plants genetics and breeding I.D. Tanksley, T.J. Orton (Eds.). Amsterdam, Elsevier Science. p. 219-240.
3. COVAS, G. 1974. Las variedades de pasto llorón (*Eragrostis curvula*) cultivadas en la provincia de La Pampa, R.A. In Simposio sobre Pasto Llorón (2, Buenos Aires, Arg.). Santa Roca, La Pampa, Arg., Colegio Ingenieros Agrónomos. Jornada Técnica.
4. COVAS, G.; CARNIE, A. 1985. El pasto llorón (*Eragrostis curvula*): Manual con información básica y normas para su cultivo y utilización. Buenos Aires, Arg., Ed. Hemisferio Sur.
5. DI RENZO, M.A.; POVERENE, M.M.; MEDINA, M.I. 1987. Variabilidad isoenzimática en granos de pasto llorón, *Eragrostis curvula* (Schr.) Nees: Su aplicación en la identificación de cultivares. Revista de Investigaciones Agropecuarias. (En prensa)
6. LEIGH, J.H.; DAVIDSON, R.L. 1968. *Eragrostis curvula* (Schr.) Nees and some other African lovegrasses. Plant Introduction Review CSIRO 5:21-44.
7. MEDINA, M.I.; DI RENZO, M.A.; TIRANTI, I.N. 1985. Identificación de cultivares de pasto llorón *Eragrostis curvula* (Schr.) Nees, por medio de esterases, fosfatasas y paroxidasas. Revista de Investigaciones Agropecuarias 20:1-9.
8. POVERENE, M.M.; DI RENZO, M.A.; CURVETTO, N.R. 1988. Diferenciación de cultivares de pasto llorón, *Eragrostis curvula* (Schr.) Nees, mediante electroforesis de isoenzimas. Turrialba 38:173-178.
9. SMITH, R.L. 1972. Sexual reproduction in *Panicum maximum* Jacq. Crop Science 12:624-627.
10. SOLTIS, D.E.; HAUFLER, C.; DARROW, D.; GASTONY, G. 1983. Starch gel electrophoresis of ferns: A compilation of grinding buffers gel and electrode buffers staining schedules. American Fern Journal 73:9-27.
11. STREEMAN, L.J. 1963. Reproduction of lovegrass: The genus *Eragrostis* *E. chromelas* Steud., (Schr.) Nees, *E. lehmannii* Nees and *E. superba* Peyr. Wrightia 3:41-51.
12. VALLEJOS, E. 1983. Enzyme activity staining. In Isozymes in plant genetics and breeding. I.S.D. Tanksley, T.J. Orton (Eds.). Amsterdam, Elsevier Science Publishers. p. 469-516.
13. VOIGT, P.W. 1971. Discovered of sexuality in *E. curvula*. Crop Science 11: 424-425.
14. VOIGT, P.W.; BASHAW, E. 1972. Apomixis and sexuality in *Eragrostis curvula*. Crop Science 12:843-847.
15. VOIGT, P.W.; BASHAW, E. 1976. Facultative apomixis in *Eragrostis curvula*. Crop Science 16:803-806.
16. VOIGT, P.W.; BURSON, B.L. 1983. Breeding of apomitic *Eragrostis curvula*. In International Grassland Congress (14.). Proceedings. J.A. Smith, V.W. Hays (Eds.). EE.UU., Westview Press. p. 160-163.

Aspects of Leaf Nitrogen Metabolism in Two Cultivars of Tomato Under Water Deficit¹

M. Castrillo*, D. García*

ABSTRACT

The effects of water deficit on free amino acid, proline and protein contents and proteolytic activity were studied in leaves of plants of two cultivars of tomato (Pera Quibor and Río Grande). During the water deficit period, the values of water potential, osmotic potential, osmotic potential at full turgor and relative water content decreased. The leaf free amino acid and proline contents were higher, whereas the protein content decreased and then showed fluctuations in plants under water stress. The leaf proteolytic activity was also higher and fluctuating. Such fluctuations inversely corresponded with observed fluctuations in protein content for both cultivars. The increase and fluctuations in free amino acid content are both a consequence of the changes in proteolytic activity. These results show that during the water deficit period there are alternating intervals of decreased and increased protein content. The former interval is due to increase proteolytic activity and is the main factor responsible for the increased free amino acid content. The latter interval may be the result of the synthesis of new protein at the expense of existing leaf protein. There is a positive correlation between osmotic potential and proline content, but the observed values of osmotic potential at full turgor indicate that osmotic adjustment did not occur.

Key words: Free amino acids, proline, proteolytic activity, protein, drought.

INTRODUCTION

It has been reported that, in plants under water deficit, protein synthesis decreases (16). Another plant response to water deficit is the accumulation of amino acid, specifically proline, which has been reported for many species (1). Recently, qualitative and quantitative changes have been found (29) in the protein

COMPENDIO

Los contenidos de aminoácidos, prolina y proteína y la actividad proteolítica en hojas fueron analizados en plantas de tomate de dos cultivares (Pera Quibor y Río Grande), sometidas a déficit hídrico. Durante el período de déficit hídrico, los valores de los potenciales, hídrico, osmótico y osmótico a pleno turgor y del contenido relativo de agua disminuyeron. En plantas bajo déficit hídrico, los contenidos foliares de aminoácidos y prolina fueron mayores, el contenido foliar de proteína disminuyó y mostró fluctuaciones y la actividad proteolítica foliar fue mayor, mostrando fluctuaciones inversas a las observadas en el contenido de proteínas. El incremento y fluctuaciones en el contenido de aminoácidos son consecuencia de la actividad proteolítica. Se observa que, durante ese período, existen intervalos de menor contenido proteico por una mayor actividad proteolítica, y es el principal factor responsable del aumento en el contenido de aminoácidos, seguido por intervalos de contenido proteico mayor, lo cual pudiera ser el resultado de síntesis de nueva proteína a expensas de la foliar existente. Hay una correlación positiva entre el potencial osmótico y el contenido de prolina, pero los valores obtenidos para el primero a pleno turgor indican que no ocurrió el ajuste osmótico.

patterns of *Brassica napus* var. Oleifera roots, under physiological conditions of drought, and it has been reported that maize seedlings respond to water stress with the synthesis of stress specific proteins (4). For mesophytic crop plants in drought-prone environments, the identification of adaptative metabolic traits has specific importance because such traits might be exploited in plant breeding for drought resistance (14).

The aim of the present work was to study the effects of water deficit on proteolytic activity as well as protein and free amino acid contents in two tomato (*Lycopersicon esculentum*) cultivars: Pera Quibor and Río Grande, and to establish the relationship between these parameters. The increase in proline content was also analyzed. Every measurement was done in order to understand how these metabolic parameters change

¹ Received for publication 7 December 1990.

Financial support by Venezuelan Council for Scientific and Technological Research (CONICIT) Project S1-1325. Seeds of the two selected cultivars of tomato were supplied by Venezuelan National Fund for Agriculture and Animal Husbandry (FONAIAP).

* Dept. Biología de Organismos, Universidad Simón Bolívar. Apdo. Postal 890000, Caracas 1080, Ven.

and how they interplay during the tested water deficit period.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Seeds from two selected cultivars of tomatoes, Rio Grande and Pera Quibor, were supplied by Venezuelan National Fund for Agricultural and Husbandry (FONAIAP), Maracay. The seeds were germinated on wet paper in plastic trays. After germination, the seedlings were transferred to sand and, at the appearance of the cotyledons, the plants were transferred to 5 l plastic pots (one per pot).

These were kept for daily watering in a greenhouse with $30 \pm 2.2^\circ\text{C}$ average maximum temperature; $17.5 \pm 2.3^\circ\text{C}$ average minimum temperature; 97.6% average maximum RH; 58% average minimum RH; and $655.7 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ average sun radiation. Forty-six day-old plants were used for experiments. Watering of 80 plants was withheld (water-stressed plants). Forty plants were watered throughout the experiments and maintained as controls. Measurements on water-stressed plants and control plants (watered) were carried out at two-day intervals over a period of two weeks. The youngest, most expanded leaves were used. A set of four replicates were used for the measurement of all parameters (Y_w , Y_s , Y_{st} , RWC, proteolytic activity, protein, free amino acid and proline contents), resulting in four sets of each.

Water potential (y_w), osmotic potential (y_s) and relative water content

All measurements were made before dawn. For Y_w measurements, four leaflets from each of the four replicates were introduced in a L-44 sealed chamber (Wescor Inc., Logan, Utah, USA) attached to a HR-33T Dew Point microvoltmeter (Wescor Inc. Logan, Utah, USA). After measuring Y_w , the leaves were frozen and Y_s was measured in the expressed sap using the HR-33T dew point microvoltmeter attached to C-52 chambers (Wescor Inc., Logan, Utah, USA). For determinations of Y_{st} , the leaflets were floated in water during 24 h at 4°C ; after which the Y_s was measured as before. For RWC measurements, the method reported by Turner (28) was followed.

Free amino acid determination

The amino acid extraction was performed following the method reported by Singh *et al.* (23). The ninhydrin method was used for the determination of free amino acid content. The ninhydrin reagent was prepared according to the method reported by Benson and Petterson (2). The absorbance was measured at 570 nm using a double-beam spectrophotometer (Shimadzu, modUV-150) and the values obtained were extrapolated to mmol of free amino acid using a calibration curve run with sodium -L-glutamic acid (Sigma).

Proline determination

The proline content was assayed using the same extracts employed for amino acid analysis and following the method described by Singh *et al.* (23). The absorbance at 515 nm was measured. The values obtained were extrapolated using a calibration curve generated with DL-proline (Sigma).

Protease extraction and proteolytic activity

The test was performed according to Feller *et al.* (8). The assays used azocasein (Sigma) as substrate. The absorbance at 440 nm was measured. The absorbance values were extrapolated to μg of azocasein in a calibration curve run with azocasein.

Protein content

Aliquots taken from the same extract obtained for proteolytic activity were precipitated with 15% trichloroacetic acid, centrifuged and the pellet resuspended with 0.2 N NaOH; estimation of protein content followed the method of Bradford (5).

Statistical analysis

The regression coefficient, the Pearson and the Spearman rank tests were used for correlation (26).

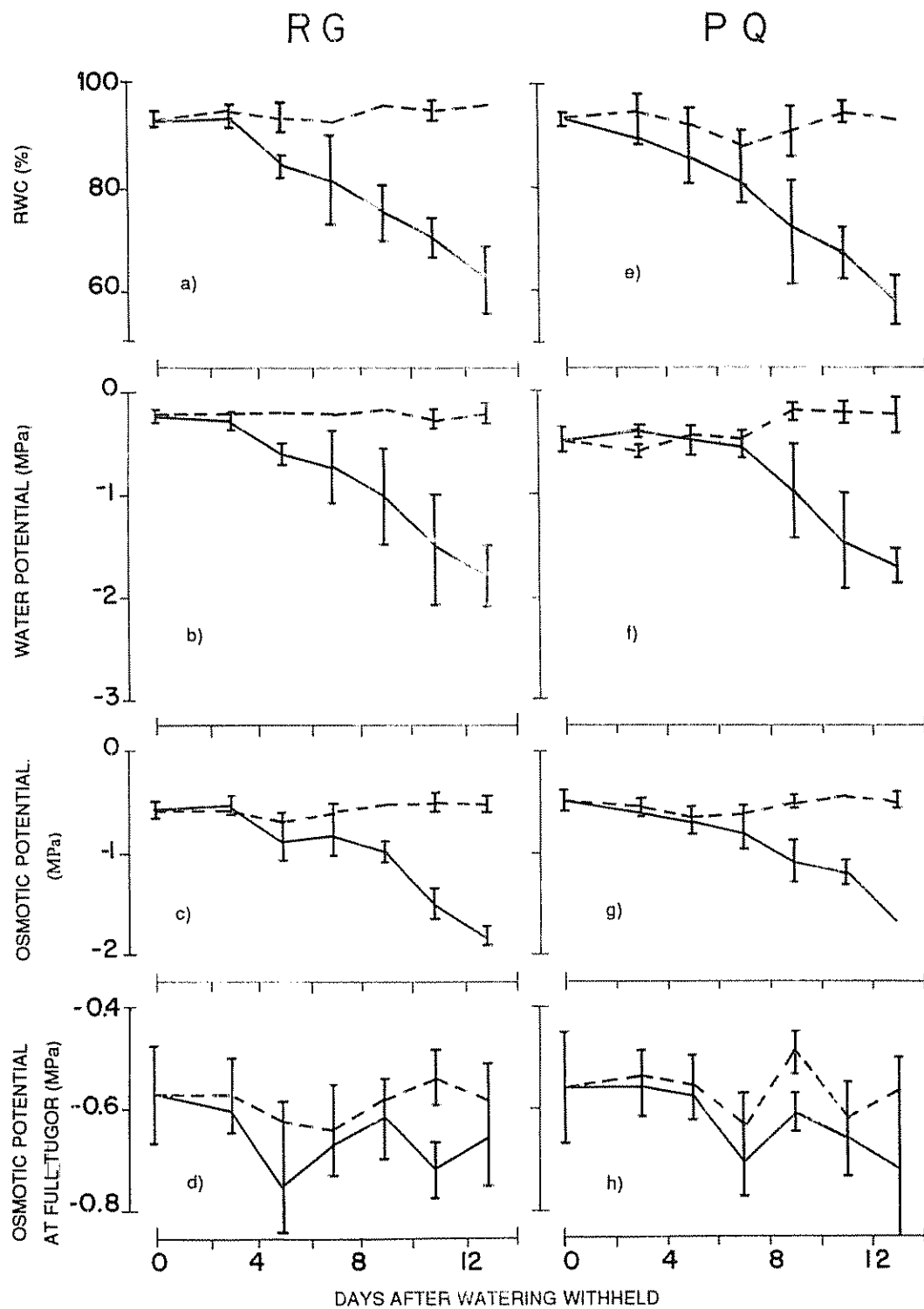


Fig. 1. a - c: Relative water content, RWC (%); b, f: leaf water potential, Y_w (MPa); c, g: osmotic potential, Y_p (MPa); osmotic potential at full turgor, Y_{p0} (MPa) in control and water stressed tomato plants of two cultivars, Pera Quibor (PQ) and Rio Grande (RG), during the treatment period. Each value represents the mean of four replicates, and the bars represent the standard deviation (SD). Dashed lines represent control values.

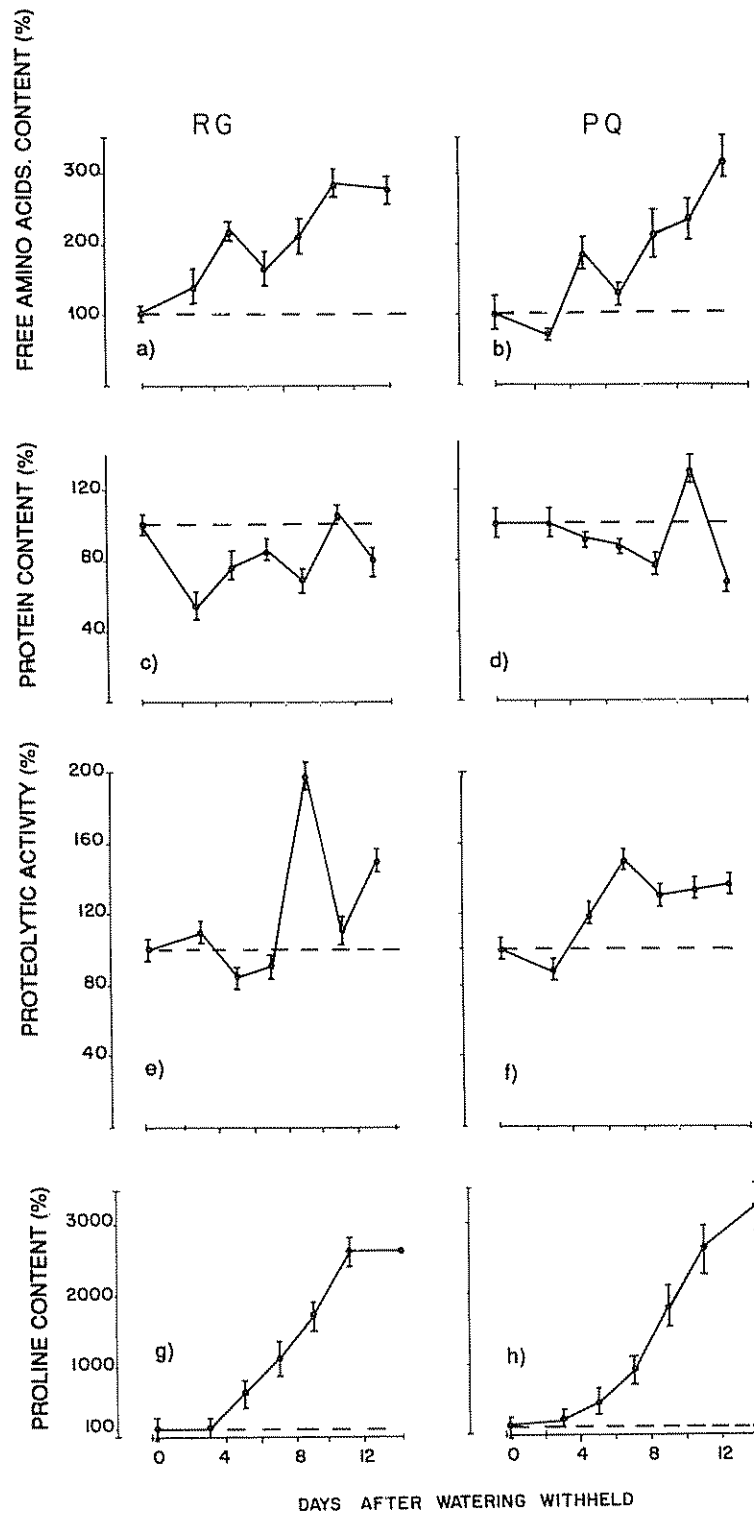


Fig. 2. a-e: % free amino acid content (mol/kgDW); b-f: % protein content (g/kgDW); c-g: % proteolytic activity (g azocasein/kgDW⁻¹); d-h: % proline content (mol/kgDW) in water-stressed tomato plants with respect to control of two cultivars, Pera Quibor (PQ) and Rio Grande (RG), during the period of treatment. Each value represents the mean of four replicates, and the bars represent the standard deviation (SD). Dashed line represent control values.

RESULTS AND DISCUSSION

The values of Y_w , Y_s and RWC measured throughout the treatment for control plants (watered plants) and water-stressed plants of both cultivars are shown in Figure 1 (a-g). A decrease in these values is observed in water-stressed plants. The values of Y_{st} for control and water-stressed plants of both cultivars showed no differences, as seen in Figure 1 (d-h). Figure 2 shows the % free amino acid content(mol/kgDW) (2a-e); % protein content (g/kgDW) (2b,f); % proteolytic activity (g azocasein/kgDW.h) (2c- g) and % proline content (mol/kgDW) (2d, h) in water-stressed plants with respect to control for both cultivars.

In the RG cultivar, the percentage increase in free amino acid content (Fig. 2a) was paralleled by a decrease in protein content (Fig. 2b) below the control levels, and by a slight increase in proteolytic activity (Fig. 2c) on the third day of water withholding. This could suggest that, under mild water deficit, the protein content decreases as a result of an increase in proteolytic activity and possibly a decrease in protein synthesis, leading to an increase in the free amino acid content. On the fifth and seventh days, the protein content showed an increase below control levels, which could be due to a lower proteolytic activity and to new protein synthesis at the expense of available free amino acids.

On the ninth day, the proteolytic activity increased, thus decreasing the protein content and increasing the percentage of free amino acids; but on the 11th day, there was an increase in protein content above control level, possibly due to a decreased in proteolytic activity and an increase in protein synthesis. On the thirteenth day, the protein content decreased due to the increase in proteolytic activity. The free amino acid content remained high from the ninth day onwards, possibly due to a sharp increase in proteolytic activity on the ninth and thirteenth days after watering was withheld.

For PQ cultivar, it was observed that on the third day, the percentage of amino acid content (Fig. 2e) and proteolytic activity (Fig. 2g) were lower than in control plants. The protein content is similar to control (Fig. 2f). Figure 1e shows that the leaf Y_w values of plants of PQ cultivars under water stress did not decrease at the onset of water stress. However, on the fifth day, a decrease of leaf Y_w in water-stressed plants is observed. From fifth day onward, an increase in percentage of free amino acid content (Fig. 2e) and percentage of proteolytic activity (Fig. 2g) above control levels was observed, with a decrease in protein content (Fig. 2f) below

control levels; the latter parameter was seen to increase on the eleventh day, suggesting that there was protein synthesis at the expense of available free amino acids and that the protein synthesis could be higher than protein degradation.

There was a positive correlation between Y_s and proline content (Table 1); however, the obtained values of Y_{st} (Fig. 1d and 1h) prove that osmotic adjustment did not occur, indicating that proline does not contribute to important changes in the leaf osmotic potential, as has been previously reported (17).

Table 1. Correlations coefficients (Spearman) among leaf water components and free amino acids, protein content and proteolytic activity, regression coefficient (r^2) for proline content and RWC and Y_s and Pearson coefficient (r) for proline content and Y_w in two tomato cultivars under water deficit.

| | Cultivar | RWC | Y_w | Y_s |
|---|----------|---------|---------|---------|
| Free amino acid (mol/kgDW) | RG | 0.011 | -0.054 | 0.017 |
| | PQ | -0.551* | -0.428* | -0.457 |
| Protein content (g/kgDW) | RG | -0.500* | -0.485* | -0.531* |
| | PQ | 0.551* | -0.473* | -0.457* |
| Proteolytic activity (g azocasein/kgDW) | RG | -0.575* | -0.563* | -0.545* |
| | PQ | -0.245 | -0.209 | -0.233 |
| | | r^2 | r | r^2 |
| Proline content (mol/kgDW) | RG | 0.89* | -0.892* | 0.84* |
| | PQ | 0.88* | -0.906* | 0.77* |

Significant for $\alpha = 0.05$

Table 1 presents the correlation coefficients (Spearman) among leaf water components and free amino acids, protein content and proteolytic activity; the regression coefficient among proline content, RWC and Y_s and the Pearson coefficient between proline content and Y_w . There were some significant correlations among the measured parameters and some components of leaf water status for both cultivars, although this significance was more marked in protein and proline contents for both cultivars. For free amino acid content, there was no significant correlation for the RG cultivar; a similar situation was found in the PQ cultivar with respect to proteolytic activity.

A significant increase in the content of amino acids, especially proline, during leaf wilting caused by water deficit has been reported (9, 10, 14, 18, 19, 21, 23). This increase could be attributed to an imbalance between decreased protein synthesis and increased

protein degradation as observed during the water deficit period. Lawlor and Fock (18) reported that water deficiency might produce accumulation of certain amino acids due to changes in metabolic paths. The authors explained that the synthesis of amino acids was stimulated by the accumulation of organic acids in plants under water deficit and that the source of NH_4 comes from protein degradation.

Working with young bean plants under water deficit, we observed (7) a decrease and subsequent fluctuations in protein content, paralleled by an increase and subsequent fluctuations in the ammonium content. Significant changes in the content of free amino acids in wilted tomato leaves have been reported (2). The results presented in this work show that the increase in free amino acid content is directly related to the increase in proteolytic activity (Fig. 2ae and 2cg).

The leaf proline content increased drastically in both cultivars during the water deficit period (Fig. 2d,h). As is already known, a very marked increase in free proline content occurs in leaf tissue of many mesophytic plants during hours to days of moderate to severe water deficit (12).

It has been indicated (12, 13, 27) that proline accumulation does not present any adaptive value for survival during severe water deficit periods. However, Aspinall and Paleg (1) suggested that the accumulation of proline during periods of water stress has a definite evolutionary advantage in that it endows the cell with a measure of resistance, and that this is not merely a consequence of stress-impaired metabolism. It was reported that in five barley cultivars under water deficit, once the water deficit was removed from all cultivars, the relative growth rate of the cultivars during the recovery period was directly related to the amount of proline accumulated during the water deficit period (24). Blum and Ebercon (3) also suggested that proline may have a positive effect in the immediate recovery of plants after release from stress. Using contrasting sorghum lines under drought stress, it was reported (25) that susceptible lines accumulated less proline than resistant lines. The data, calculated from the immediate recovery of resistant lines after rewatering, compared well with the levels of proline accumulated during the peak stress period. The authors concluded that proline

accumulation may, therefore, contribute to the immediate recovery of plants. Working with 39-day-old plants of the same cultivars used in the present work under water deficit and rewatering (6), it was found that all parameters measured showed a gradual recovery after rewatering, reaching or even surpassing the values of control plants, indicating that the high increase in proline content observed in the present work could be associated with a high potential of leaf survival.

In the present work, we found decreased protein content in plants under water deficit, but this decrease showed fluctuations, indicating new protein synthesis and, in some cases, the protein content exceeded that of control plants (105% in RG and 130% in PQ) (Fig. 2b,f). This observed increase in protein content could be due to new protein synthesis geared specifically to produce new water-stress protein. The synthesis of a new water-stress protein has been previously reported (4, 15, 22, 29). It has been concluded that, although the physiological significance of the protein synthesis induced in response to altered environmental conditions is not yet clearly understood, their synthesis appears to be related to the acquisition of a better resistance to the adverse inductive factor. Our results showed that during water deficit in the two studied tomato cultivars, there were intervals of decreased protein content due to an increased proteolytic activity, the main factor responsible for the increased free amino acid content observed, and increased protein content which could be the result of new protein being synthesized at the expense of existing leaf protein.

LITERATURE CITED

1. ASPINALL, D.; PALEG L.G. 1981. Proline accumulation: Physiological aspects. In *The physiology and biochemistry of drought resistance in plants*. L.G. Paleg, D. Aspinall (Eds.). Sydney, Academic Press. p. 205-224
2. BENSON, I.V.; PETERSON J.A. 1973. Chromatographic advances in amino acid and peptide analysis using spherical resins and their applications in biochemistry and medicine. In *New techniques in amino acid and protein analysis*. A. Nedrewieser, G. Pataki (Eds.). New York, Ann Arbor Science Publisher. p. 1-73
3. BLUM, A.; EBERCON, A. 1976. Genotypic responses to drought stress. III. Free proline accumulation and drought resistance. *Crop Science* 16:428-431.

- 4 BONHAM-SMITH P C ; KAPOOR M ; BEWLEY J.D. 1981. A comparison of the stress response of *Zea mays* seedlings as shown by qualitative changes in protein synthesis. Canadian Journal of Botany 66:1883-1890.
- 5 BRADFORD, M. 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding Analytical Biochemistry 72:248-254
- 6 CASTRILLO, M ; CALCAGNO, A M. 1989 Effects of water stress and rewatering on ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase activity, chlorophyll and protein contents in two cultivars of tomato The Journal of Horticultural Science 64:717-724.
- 7 CASTRILLO, M ; FERNANDEZ, D ; FERNANDES, P ; MOLINA, B ; KAZANDJIAN A. 1990. Metabolismo del nitrógeno en *Phaseolus vulgaris* L. bajo déficit hídrico. Turrialba 40(4):515-519.
- 8 FELLER, U.K ; SOONG, T T ; HAGEMAN, R.H 1977 Leaf proteolytic senescence during grain development of field-grown corn (*Zea mays* L.) Plant Physiology 59:290-294.
- 9 FUKUTOKU, Y ; YAMADA, Y. 1981a. Diurnal changes in water potential and free amino acid contents of water-stressed and non-stressed soybean plants. Soil Science Plant Nutrition 27(2):195-204.
- 10 FUKUTOKU, Y ; YAMADA Y. 1981b. Sources of proline-nitrogen in water-stressed soybean (*Glycine max*) I. Protein metabolism and proline accumulation Plant Cell Physiology 22:1397-1404.
- 11 FUKUTOKU, Y ; YAMADA Y. 1984 Sources of proline-nitrogen in water-stressed soybean (*Glycine max*) II Fate of ¹⁵N-labeled protein Physiologia Plantarum 61:622-628.
- 12 HANSON, A D ; NELSEN, C E ; EVERSON, E.H. 1977 Evaluation of free proline accumulation as an index of drought resistance using two contrasting barley cultivars Crop Science 17:720-726.
- 13 HANSON, A D ; NELSEN, C.E ; PEDERSEN, A R ; EVERSON, E.H 1979 Capacity for proline accumulation during water stress in barley and its implications for breeding for drought resistance. Crop Science 19:483-493
- 14 HANSON, A D ; HITZ, W.D. 1982 Metabolic responses of mesophytes to plant water deficits. Annual Review of Plant Physiology 33:163-203.
- 15 HEIKILÄ, J J ; JET PAPP SCHULTZ, G A ; BEWLEY, J D. 1984 Induction of heat shock protein messenger RNA in maize mesocotyl by water stress, abscission and wounding Plant Physiology 76:270-274
- 16 HSIAO, T C 1973 Plant responses to water stress Annual Review of Plant Physiology 24:519-570.
- 17 JONES, M.M ; OSMOND, C.B. ; TURNER, N C 1980. Accumulation of solutes in leaves of sorghum and sunflower in response to water deficits. Australian Journal of Plant Physiology 7:193-205
- 18 LAWLOR, D W ; FOCK, H. 1977 Water-stress induced changes in the amounts of some photosynthetic assimilation products and respiratory metabolites of sunflower leaves. Journal of Experimental Botany 28:169-173.
- 19 LEVI, D. 1983 Water deficit enhancement of proline and amino nitrogen accumulation in potato plants and its association with susceptibility to drought. Physiologia Plantarum 57:169-173.
- 20 MARKOVA, T.A. ; REKOSLAVSKA, N.I. ; GAMBURG, K.Z. ; SHVETSOV, S.G. ; KONDRASHOV, V.V. 1988 D-tryptophan is the only D-amino acid formed in tomato leaves. Sovietic Plant Physiology 35(22):263-267.
- 21 MCMICHEL, B L ; ELMORE, C.D. 1977. Proline accumulation in water-stressed cotton leaves Crop Science 17:905-908
- 22 SACHS, M.M ; T-H D., HO 1986 Alteration of gene expression during environmental stress in plants. Annual Review of Plant Physiology 37:363-376.
- 23 SINGH, T N ; ASPINALL, D ; PALEG, L.G ; BOGGES, S.P. 1973a. Stress metabolism: Changes in proline concentration in excised plant tissues. Australian Journal of Biological Sciences 16:57-63.
- 24 SINGH, T.N. ; PALEG, L.G ; ASPINALL, D 1973b. Stress metabolism. III. Variations in response to water deficit in the barley plant. Australian Journal of Biological Sciences 26:65-76.
- 25 SIVARAMAKRISHNAN, S ; VILLOO, Z ; PATELL, FLOWER, D J ; PEACOCK, J M. 1988 Proline accumulation and nitrate reductase activity in contrasting sorghum lines during mid-season drought stress Physiologia Plantarum 74:418-426
- 26 SOKAL, R R ; ROHLF, F J. 1981. The principles and practice of statistics in biological research San Francisco, W H. Freeman. 776 p.
- 27 STEWART, C.R ; HANSON, A D 1980 Proline accumulation as a metabolic response to water stress In Adaptations of plants to water and high temperature stress N C Turner, P J Kramer (Eds) p 173-189
- 28 TURNER, N C 1981. Techniques and experimental approaches for the measurements of plant water status. Plant and Soil 58:339-366.
- 29 VARTANIAN, N ; DARNERVAL, C ; DE VIENNE, D 1987 Drought-induced changes in protein patterns of *Brassica napus* var. *Oleifera* roots. Plant Physiology 84:989-992.

Compuesto de Amplia Base Genética de Maíz Tropical. I. Respuesta a la Selección¹

R.E. Preciado*

ABSTRACT

The development of a broad genetic base composite (BGBC) of tropical maize varieties began in the 1981 rainy season at Cotaxtla experiment station in Veracruz, Mexico. The BGBC was made up mainly of Tuxpeño tropical germ plasm, and was formed in isolated detasseling lots. The male composite was formed with 20 of the best-performing components of the BGBC and the female rows were one of each of the BGBC components; the recombination was repeated for six cycles. Selection was carried out in each cycle in both male and female rows. In the males, this was by done by detasseling plants with lodging, diseases, tallness or with silking delay problems, and total detasseling when 80% of the pollen shedding occurred in order to select for earliness. Within the female rows, the selection was practiced in plants with good grain yield, plant health, husk coverage, no lodging, and moderate height. The results show that the average behavior of the components of the BGBC, through all cycles and environments, showed selection responses for yield, plant and ear height, and lodging percentage.

Palabras claves: *Zea mays* L., selección, base genética, rendimiento, características agronómicas, recombinación genética.

COMPENDIO

En el Campo Agrícola Experimental Cotaxtla en Veracruz, Méx., se inició, en 1981, la formación de un compuesto de amplia base genética (CABG), con germoplasma tropical, principalmente de la raza Tuxpeño. El CABG se formó en lotes aislados de desespigamiento, utilizando como macho un compuesto mecánico balanceado de los mejores componentes, y como hembras cada uno de los componentes que integraron el CABG. La recombinación se llevó a cabo durante seis ciclos, y, en cada uno, se realizaron selecciones en el macho polinizador y en las hembras. En el compuesto macho se eliminaron las espigas de las plantas acamadas, enfermas, extremadamente altas y con problemas de sincronía de floración; además se practicó desespigue total al llegar al 80% de floración, con el fin de seleccionar ligeramente hacia precocidad. En las hembras se escogieron plantas con buen rendimiento, sanas, con competencia completa, buena cobertura de mazorca, no acamadas ni demasiado altas. De los resultados, se concluyó que el comportamiento medio del CABG, por medio de ciclos y localidades, mostró una respuesta a la selección en rendimiento, altura de plantas y de mazorca, porcentaje de acame y días de floración masculina y femenina.

INTRODUCCION

En el proceso de formación de compuestos de amplia base genética (CABG), por lo general, se utilizan criterios de selección tendentes a mejorar el compuesto, con el fin de que resuelva, de alguna manera, los principales problemas de adaptación del cultivo a la zona de destino. Particularmente, en el desarrollo del CABG formado en el Campo Cotaxtla en Veracruz, a partir de 1981, el criterio de selección incluyó los caracteres: rendimiento, altura de planta y de mazorca, resistencia al acame, eliminación de plantas tardías, sincronía de floración masculina y femenina, entre otros; tratando de obtener plantas con mayor rendimiento y resistencia a los vientos y a la sequía intraestival.

¹ Recibido para publicación el 20 de junio de 1991

Parte de este trabajo fue presentada por el autor en la tesis de Maestría en Ciencias, Colegio de Postgraduados, Chapingo, Méx.

Se agradece a los investigadores y personal de campo del Programa de Maíz del Campo Experimental Cotaxtla, por su apoyo en la formación del material genético de este estudio y a los doctores Fidel Márquez Sánchez y Lauro Bucio Alanís, por su dirección en la evaluación y análisis de la información contenida en este artículo

* Ex investigador del Programa de Maíz, Campo Experimental Cotaxtla, Veracruz, Méx. Actualmente realiza estudios de doctorado en la Universidad de Nebraska, EE.UU.

El objetivo de este artículo es presentar la respuesta a la selección en seis ciclos de integración de un CABG de maíz tropical.

REVISION DE LITERATURA

La magnitud de variabilidad genética de las poblaciones depende del número de sus componentes y de la diversidad genética entre ellos, que se incrementa por su recombinación (3).

Si una raza presenta variabilidad genética reducida y se mezcla con otros materiales semejantes, puede aumentar la variabilidad significativamente, lo mismo que el potencial de selección, al aprovechar la diversidad genética en las poblaciones de maíz, dentro de los límites de un área dada (2, 5).

Pandey *et al.* (3) informan que las poblaciones desarrolladas constituyen un receptáculo de variabilidad genética que deberá ser aprovechado para mejorar aquellas características de mayor utilidad para productores y consumidores. El mejoramiento poblacional depende del aumento en la frecuencia de los alelos favorables. Así, la sustitución de los alelos desfavorables por los favorables y su frecuencia en cada locus son causas directas del mejoramiento que pueda lograrse en una población.

La variancia genética aditiva, para un carácter dado, es la de los valores reproductivos, determinada por la suma de efectos medios, que se calcula sobre el par de alelos en cada locus de las plantas. En maíz, ese tipo de variancia genética aditiva es relativamente de mayor magnitud que las no aditivas, y los genes que las determinan se pueden fijar y acumular mediante selección.

Por otro lado, cuando los efectos de dominancia son importantes se puede obtener una heterosis relativamente alta en las cruza intervarietales, y cuando se forma el compuesto se espera que el rendimiento en la nueva población sea mayor que el promedio de las variedades parentales, pues los compuestos son capaces de retener la porción de los efectos heteróticos. Por lo tanto, el uso de CABG puede considerarse como un método de utilización directa para la heterosis en las cruza intervarietales. Además, debido a que las frecuencias génicas en la nueva población serán los promedios de las variedades parentales, las génicas en muchos loci se moverán entre cero y uno a valores intermedios (1, 6).

Con respecto a la selección que procura los efectos genéticos aditivos, Hallauer y Miranda (1) afirman que existen características como el vigor, sanidad y resistencia o tolerancia a plagas y enfermedades, las cuales, generalmente, poseen una hereditabilidad más alta que el rendimiento. Debido a lo anterior, las poblaciones básicas pueden mejorar en estas características, con alta hereditabilidad, en un tiempo relativamente corto.

MATERIALES Y METODOS

Integración y selección de compuestos

El material genético utilizado en este estudio incluyó algunos materiales (componentes) que integraron el CABG formado en el Campo Agrícola Experimental Cotaxtla. En el Cuadro 1 se presenta la relación de materiales con que se inició la recombinación del CABG. Tales materiales fueron sobresalientes en varios ciclos y localidades de prueba, tanto en el estado de Veracruz como en el país (4).

Cuadro 1. Componentes del CABG usados como hembras y como machos en los seis ciclos de recombinación-selección.

| Recolectas | Híbridos | Variedades | Poblaciones |
|---------------|----------|------------|-------------|
| Ver 6 77A * | H-503 * | V-522 * | COT II * |
| Chis 501 * | H-507 * | V-524 * | COT XIV * |
| Chis 455 | H-510 * | VS-525 * | COT XV * |
| Chis 511 | H-511 * | CGB II * | COT XVII * |
| Chis 417 | HEV-3 * | Sint 12 * | COT XVIII * |
| Chis 462 | H-452 | VS-521 | COT XXXI * |
| Chis 664 | | Llera III | COT XXXII * |
| Tams 129 | | | Tuxp C-17 * |
| Tams 65 | | | COT I |
| Sin 30 | | | COT III |
| Ver 5 77A | | | COT VI |
| Ver 10 77A | | | COT V |
| Criollo D. H. | | | |
| Chis 535 | | | |

* Materiales que formaron el compuesto mecánico balanceado que intervino como macho en cada ciclo.

La integración y selección del compuesto se llevaron a cabo durante los ciclos de temporal y de riego, entre 1981 y 1984. La metodología de formación del compuesto fue la siguiente:

1. Los componentes de alto rendimiento se escogieron con base en la información de ensayos de varios ciclos y localidades, en la zona cálida-húmeda de México.

2. Con los componentes superiores se formó un compuesto mecánico balanceado para utilizarlo como "macho" y polinizar el resto de genótipos, que se comportaron como hembras.
3. En un lote aislado de desespigamiento, se realizaron los cruzamientos; en él los materiales que actuaron como hembras se mantuvieron en densidad normal, y el compuesto macho en alta densidad.
4. El desespigue se practicó en tres modalidades: la primera fue total en los materiales hembra, en el momento de aparecer la espiga; en el segundo, se eliminaron las espigas del compuesto macho de las plantas acamadas, enfermas, demasiado altas o que no tuvieron coincidencia de floración masculina y femenina; y en la tercera, se suprimieron todas las espigas del macho al alcanzar el 80% de la floración masculina. De esa manera, en el macho se seleccionaron plantas con menor porte; resistentes al acame; más sanas; ligeramente más precoces; e, indirectamente, al seleccionar por sincronía de floración, plantas tolerantes a la sequía, y un porcentaje menor de plantas "jorras" (sin mazorca).
5. En el período de llenado de grano, se marcaron en cada surco-hembra las plantas más sanas, sin acame, con competencia completa y no muy altas.
6. En la cosecha, de las plantas marcadas en cada surco-hembra, se seleccionaron las tres mejores mazorcas de los materiales que integraron el compuesto-macho y las dos mejores en los materiales restantes.
7. El procedimiento descrito del segundo al sexto paso fue repetido hasta realizar seis ciclos de recombinación- selección.

Evaluación del efecto de la selección

La presente información fue tomada de los ensayos de campo durante el temporal de 1984 en las localidades de Cotaxtla, Veracruz, y La Huerta, Jalisco; ambas poseen un clima cálido subhúmedo y una altura sobre el nivel del mar inferior a los 500 metros.

En los dos lugares, el material genético se evaluó en un diseño de bloques al azar con arreglo factorial y

parcelas divididas, con dos repeticiones por localidad; la parcela grande fue el componente y las chicas, los ciclos.

Caracteres estudiados y análisis estadístico

Con la información de campo, se realizaron diversos tipos de análisis de variancia: por ciclo (parcela chica) en cada localidad, y combinado; por parcelas divididas completamente por localidad y combinado.

Los caracteres que se incluyen en este escrito son: rendimiento de mazorca por hectárea, días a floración masculina y femenina, altura de planta y de mazorca, y porcentaje de acame.

RESULTADOS Y DISCUSION

Con el fin de ilustrar, de manera cuantitativa, la respuesta media de los materiales que integraron el CABG en cada ciclo, en el Cuadro 2 se presenta la media de los caracteres estudiados en las localidades de La Huerta y Cotaxtla, así como en el combinado de ambas. Se puede ver que en Cotaxtla, respecto al rendimiento de la mazorca, los ciclos C_5 , C_3 , C_6 , C_2 y C_4 fueron estadísticamente superiores al C_1 y C_0 . Como el ambiente de Cotaxtla no permitió una buena expresión de los genótipos, las diferencias entre los ciclos no fueron tan marcadas; sin embargo, se observa que C_5 fue numéricamente superior a los demás, con una diferencia de 1297 kg/ha respecto al material original. Se observa, también, que en La Huerta solamente el ciclo C_5 fue estadísticamente superior en rendimiento al resto de los ciclos, con una diferencia de 1792 kg/ha en relación con C_0 ; los ciclos C_2 , C_3 , C_4 y C_6 fueron iguales entre sí y superiores a C_1 ; todos los ciclos superaron a C_0 .

En el análisis combinado de ambas localidades también el rendimiento del C_5 fue estadísticamente diferente al resto, observándose una diferencia de 1898 kg/ha entre C_0 y C_5 . En esta respuesta de magnitud pueden influir, por un lado, los efectos heteróticos debido a la diversidad genética entre los materiales que integraron el CABG y, por otro, la acumulación de genes favorables debida a la selección. El primer aspecto está de acuerdo con lo señalado por Sprague y Eberhart (6) y Hallauer y Miranda (1), quienes indican que si los efectos de dominancia son importantes, se tiene una heterosis relativamente alta; como conse-

Cuadro 2. Pruebas de significancia de medias de los caracteres estudiados en Cotaxtla, La Huerta y en ambas localidades combinadas, 1984B.

| Ciclo | Rendimiento | | | Días a Flor 0 | | | Días a Flor 0 | | |
|----------------|--------------------|-----------|-------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | Cotaxtla | La Huerta | Comb. | Cotaxtla | La Huerta | Comb. | Cotaxtla | La Huerta | Comb. |
| C ₅ | 4151a ¹ | 7794a | 5972a | 62 | 55 | 59 | 64 | 56 | 60 |
| C ₃ | 3963 _a | 7087 | 5525 | 62 | 56 | 59 | 65 | 57 | 61 |
| C ₆ | 3920 _a | 7009 | 5464 | 62 | 55 | 59 | 64 | 56 | 60 |
| C ₂ | 3831a | 6937 | 5384 | 63 | 56 | 60 | 66 | 57 | 62 |
| C ₄ | 3729 _a | 7052 | 5391 | 63 | 56 | 59 | 65 | 57 | 61 |
| C ₁ | 3684 | 6349 | 5017 | 63 | 56 | 60 | 65 | 57 | 61 |
| C ₀ | 2854 | 5295 | 4074 | 64 _a | 58 _a | 61 _a | 67 _a | 59 _a | 63 _a |
| DMSH 0.05 438 | | 576 | 362 | 0.10 | 0.06 | 0.04 | 0.16 | 0.07 | 0.05 |

| Ciclo | Altura Planta (cm) | | | Altura Mazorca (cm) | | | Acame (%) | | |
|----------------|--------------------|------------------|------------------|---------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | Cotaxtla | La Huerta | Comb. | Cotaxtla | La Huerta | Comb. | Cotaxtla | La Huerta | Comb. |
| C ₅ | 204 | 315 _a | 260 | 103 | 150 _a | 126 | 37 _a | 23 | 30 |
| C ₃ | 214 _a | 320 _a | 267 _a | 109 | 157 _a | 133 | 35 _a | 39 | 37 |
| C ₆ | 202 | 309 | 256 | 101 | 47 | 124 | 27 | 29 | 27 |
| C ₂ | 216 _a | 321 _a | 269 _a | 115 _a | 160 _a | 138 _a | 39 _a | 44 | 42 _a |
| C ₄ | 204 | 314 _a | 259 | 102 | 49 | 126 | 31 | 34 | 32 |
| C ₁ | 216 _a | 320 _a | 268 _a | 113 _a | 156 _a | 135 _a | 37 _a | 47 _a | 42 _a |
| C ₀ | 220 _a | 321 _a | 270 _a | 118 _a | 160 _a | 139 _a | 40 _a | 51 _a | 46 _a |
| DMSH 13 88 | | 11 63 | 6.37 | 7.64 | 9.26 | 4.22 | 5 | 6 | 4.7 |

1 Los valores con la misma letra son estadísticamente iguales.

cuencia, se espera que la media del compuesto sea mayor al promedio de las variedades paternas (C₀), ya que alguna porción de los efectos heteróticos puede ser retenida.

Los caracteres días a floración masculina y femenina tuvieron una tendencia similar tanto en Cotaxtla como en La Huerta y en el combinado de ambas. Se observa una disminución en C₆ de dos y tres días con respecto a la media de C₀, la cual fue estadísticamente diferente al resto de los ciclos. En el mismo Cuadro 2, al comparar las respuestas en cada ambiente, se puede ver que los materiales en general fueron más tardíos en Cotaxtla que en La Huerta. A pesar de la diferencia en ambientes, la tendencia observada hacia la precocidad es una respuesta clara a la selección practicada en cada ciclo, como consecuencia del desespigue en el macho al 80% de la floración masculina para eliminar las plantas con desarrollo tardío, y evitar que el compuesto se volviera más tardío al avanzar los ciclos.

El carácter sincronía de floración masculina y femenina no mostró respuesta clara a la selección, pues

las diferencias en este carácter se presentan, principalmente, cuando las plantas son sometidas a tensión por alta densidad, y estos ensayos fueron establecidos en densidad normal.

En el carácter "altura de planta" en Cotaxtla, los ciclos C₀, C₁, C₂ y C₃ fueron estadísticamente iguales y diferentes a los ciclos C₄, C₅ y C₆, observándose entre C₀ y C₆ una disminución en las medias de 18 centímetros. En La Huerta, este carácter mostró, en general, una mayor expresión en los materiales. Sólo C₆ fue estadísticamente más bajo al resto de los ciclos, presentando una diferencia de altura de planta promedio de 12 cm con respecto al C₀. El análisis combinado para "altura de planta" muestra que las medias de los ciclos C₀, C₁, C₂ y C₃ fueron estadísticamente iguales y mayores que los ciclos C₄, C₅ y C₆, de los cuales C₆ tuvo una diferencia de 14 cm con respecto al C₀.

En cuanto a la altura de mazorca, en Cotaxtla, los ciclos C₀, C₁ y C₂ fueron estadísticamente iguales y más altos que en el resto de los ciclos de recombinación; además se obtuvo una diferencia media entre C₀ y C₆ de

17 centímetros. En La Huerta, los ciclos C_0 , C_1 , C_2 , C_3 y C_5 fueron estadísticamente iguales y superiores a las medias de los ciclos C_4 y C_6 , observándose una diferencia de 13 cm entre la media de C_0 y C_6 . En el análisis estadístico combinado de ambas localidades, los ciclos C_0 , C_1 y C_2 resultaron iguales al resto de los ciclos de recombinación, determinándose una disminución de 15 cm entre el C_0 y C_6 .

En la respuesta de los ciclos a los caracteres "altura de planta" y "altura de mazorca" en ambas localidades, pudo haber influido la presencia de algunos materiales de porte bajo, como Tuxpeñito C_{17} , entre los progenitores machos utilizados, cuyo aporte influyó en la reducción de la altura del compuesto en general.

Para el carácter "porcentaje de acame" en Cotaxtla, los ciclos C_0 , C_1 , C_2 , C_3 y C_5 presentaron valores estadísticos iguales y más altos que los ciclos C_4 y C_6 , lo cual indica que la selección para reducirlos fue efectiva. Además llama la atención el que C_4 y C_6 sean los ciclos con menor acame, ya que su selección se efectuó en las estaciones de invierno de 1983 y 1984, respectivamente —temporada de vientos "nortes" en Cotaxtla—, lo cual sugiere que dichas condiciones pueden ser más eficaces para seleccionar hacia resistencia el acame. En La Huerta, probablemente porque las plantas crecieron más, el porcentaje de acame se incrementó a tal grado que los materiales del C_0 presentaron un promedio del 51% de acame, indicando genotipos bastante afectados.

En el Cuadro 2 se observa, en cuanto al acame, que en los ciclos C_0 y C_1 las estadísticas fueron iguales y diferentes al resto de los ciclos. En La Huerta, el ciclo con menor acame (23%) fue C_5 ; y la diferencia entre C_0 y C_5 fue del 28 por ciento. El combinado de ambas localidades para "porcentaje de acame" muestra que los ciclos C_0 , C_1 y C_2 fueron estadísticamente iguales y con más acame que el resto de los ciclos estudiados, registrándose una diferencia de 19% menos acame entre C_0 y C_6 .

Lo anterior sugiere que un buen método para la selección hacia resistencia de acame es eliminar espigas del macho de plantas acamadas y no seleccionar las hembras en las mismas condiciones; además, el hecho de someter al macho a doble densidad reduce la posibilidad de escape en las plantas susceptibles. Por otro lado, la reducción del acame en los últimos ciclos puede también explicarse como una consecuencia de la reducción de la altura de las plantas.

La tendencia de los componentes del CABG para el carácter rendimiento se presenta en las Figuras 1 y 2 donde se aprecia que con el avance de los ciclos los componentes adquiriesen mayores rendimientos. En el caso de Cotaxtla en el C_0 cuatro componentes solamente tuvieron un rendimiento superior a 4 t, en contraste con el C_5 en el que 27 componentes mostraron rendimientos mayores a esa cifra.

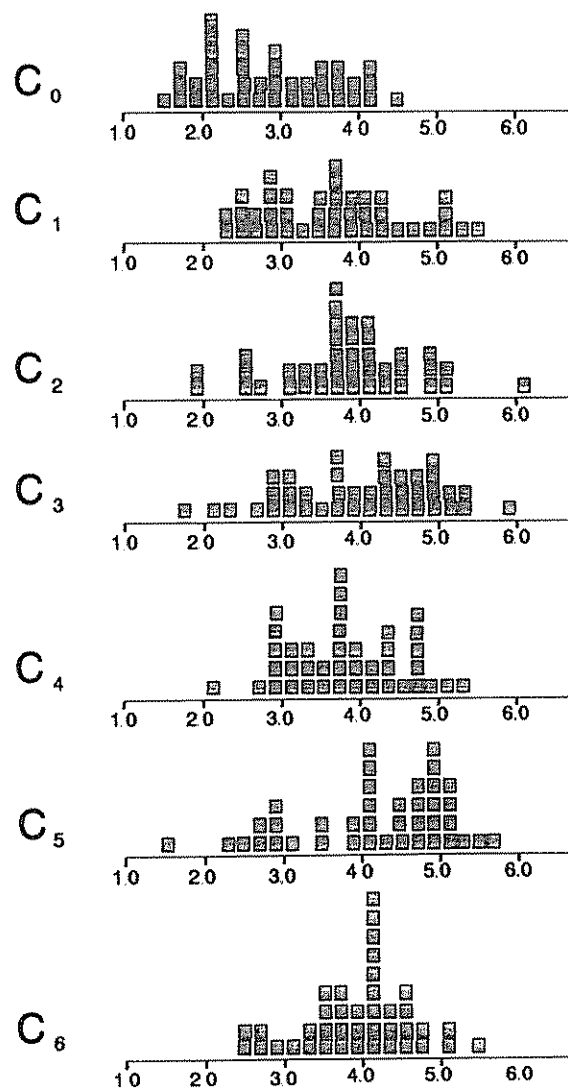


Fig. 1. Distribución de frecuencias del carácter "rendimiento de mazorca" en cada ciclo de recombinación-selección en Cotaxtla, Méx. (1984B)

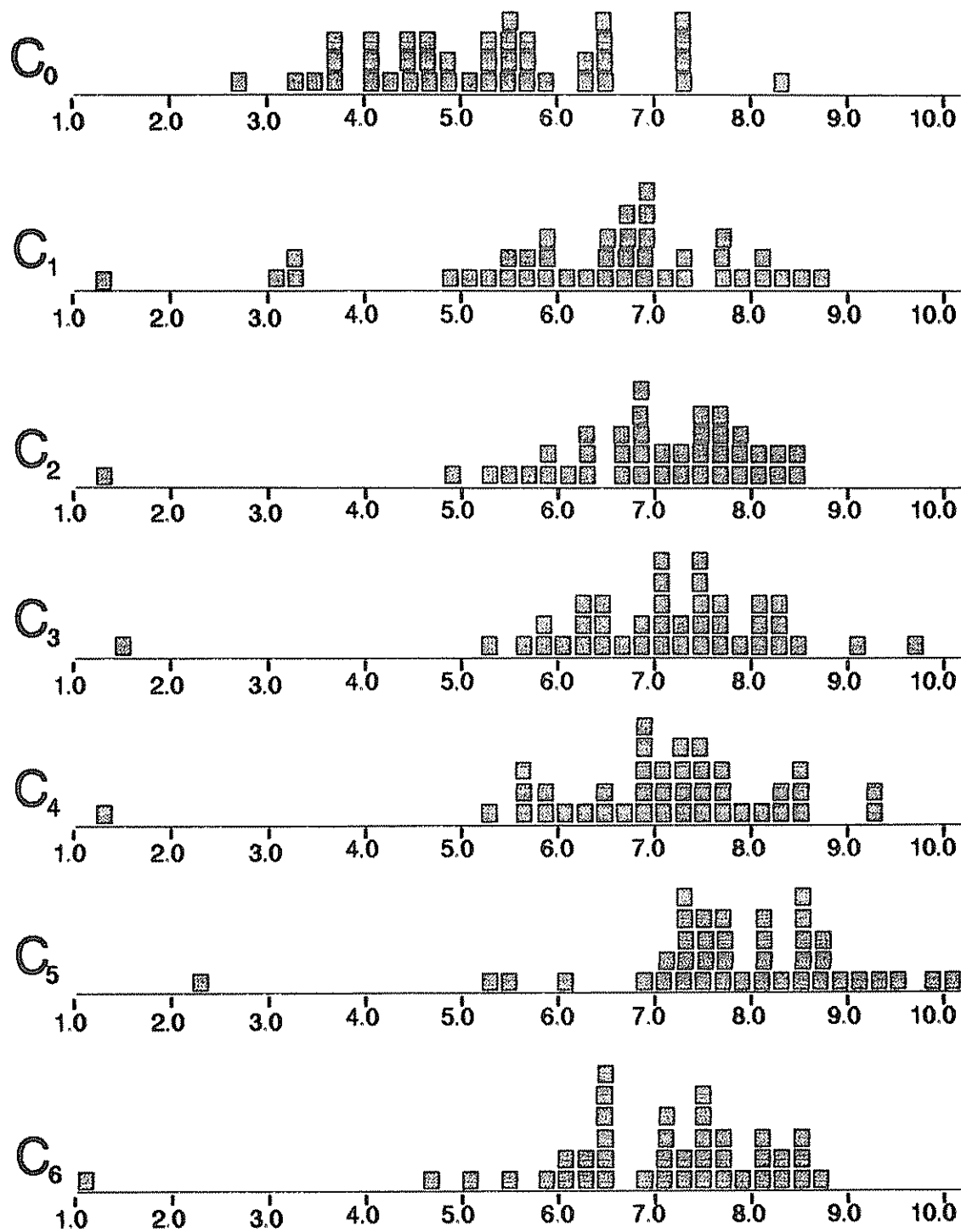


Fig. 2 Distribución de frecuencias del carácter "rendimiento de mazorca" en cada ciclo de recombinación-selección en la Huerta, Méx. (1984B)

En el caso de La Huerta, esta respuesta fue más clara; se puede observar que en C_0 sólo cinco componentes superaron 7 t, y en C_3 sólo cinco no sobrepasaron esa cantidad, lo cual muestra el avance poblacional mediante los ciclos, por la respuesta a la selección y retención de algunos efectos heteróticos.

CONCLUSIONES

- Se registraron considerables ganancias en rendimiento atribuibles, además de la selección, a la presencia y retención de efectos heteróticos por medio de los ciclos de recombinación, por la diversidad genética de los componentes del CABG:
- Se observó la respuesta a la selección para el carácter disminución de días a floración masculina y femenina, como consecuencia del desespigue practicado al 80% de la floración masculina.
- La disminución de altura de planta y mazorca se atribuye a la respuesta dada a la selección y, probablemente, también a la utilización de algunos componentes de porte bajo.
- Se observó disminución de la susceptibilidad al acame, producto de la selección y del menor porte de planta de los últimos ciclos.

LITERATURA CITADA

1. HALLAUER, R. A.; MIRANDA J. B. 1981. Quantitative genetics in maize breeding. Ames, EE. UU., Iowa State University Press. 468 p.
2. LONQUIST, J. H. 1964. Métodos de selección útiles para mejoramiento dentro de poblaciones. Fitotecnia Latinoamericana (Ven.) p. 1-10
3. PANADEY, S.; VASAI, S. K.; DE LEON, I.; ORIEGA, A.; GRANADOS, G.; VILLEGAS, F. 1982. Desarrollo y mejoramiento de poblaciones de maíz. In Reunión de Maiceros de la Zona Andina (10, 1982, Sta. Cruz, Bol.) Méx., CIMMYT. 35 p.
4. PRECIADO O., R. E. 1986. Estudio de seis ciclos de recombinación de un compuesto de amplia base genética de maíz tropical. Tesis M. Sc. Colegio de Posgraduados, Chapingo, Méx. 110 p.
5. SPRAGUE, E. W.; FINLAY, K. W. 1976. Estado actual de los recursos genéticos vegetales y su utilización. Ames, EE. UU., Iowa State University. Traducción del documento presentado en The World Food Conference, 1976.
6. SPRAGUE, G. F.; EBERHART, S. A. 1977. Corn breeding. In Corn and corn improvement. G. F. Sprague (Ed.) Madison, Wis., EE. UU., American Society of Agronomy. p. 305-362.

Compuesto de Amplia Base Genética de Maíz Tropical. II. Variancias en las Familias¹

R E. Preciado*

ABSTRACT

In order to increase the genetic variability for the humid tropics of Mexico, a broad genetic base composite (BGBC) of tropical maize varieties was made, starting in the 1981 rainy season. This composite was created through six combination cycles using 39 varieties (families) with good yield and good agronomic characteristics. The families were crossed in isolated destasseling plots. The objective of this paper was to study the genetic variation among and within the families. The field work for this study was performed during the 1984 rainy season in the Cotaxtla and La Huerta experimental stations, located in Veracruz and Jalisco, Mexico. In each location, the families showed different responses in grain yield, days to male and female flowering, and lodging percentage, while similar responses were seen in plant and ear height. It was also noted that the differences among and within families in each site tended to diminish as the cycles progressed. Thus, after six cycles, the families were integrated into a single composite.

Palabras claves: *Zea mays* L., variabilidad genética, recombinación genética, maíces tropicales.

COMPENDIO

En 1981, se inició la formación de un compuesto de amplia base genética (CABG) de maíz tropical para aumentar la variabilidad genética del programa de mejoramiento genético de maíz del trópico húmedo de México. El compuesto se formó en seis ciclos, con 39 variedades (familias) de buen rendimiento y buenas características agronómicas, en lotes aislados de desespigamiento en el Campo Experimental de Cotaxtla, Veracruz. Se presenta el análisis del proceso formativo del CABG a través de seis ciclos, en los que se involucran recombinación, selección y migración. El objetivo fue estudiar la variabilidad en y entre las familias que integraron el CABG. Las familias se evaluaron en el ciclo agrícola de temporal de 1984, en los campos experimentales de Cotaxtla, en el estado de Veracruz, y de La Huerta, en Jalisco, Méx. La respuesta en cada localidad fue diferente en rendimiento, días de floración masculina y femenina y porcentaje de acame; respuestas similares se tuvieron en altura de planta y de mazorca. Estas diferencias tendieron a reducirse a medida que avanzaron los ciclos de recombinación-selección. Esta misma tendencia se observó en las localidades en los caracteres: porcentaje de acame y días a floración masculina y femenina. Se concluyó que la variabilidad en y entre las familias se redujo con el avance de los ciclos. Por lo tanto, se concluye que en seis ciclos se logró la integración de las variedades utilizadas en un solo compuesto.

INTRODUCCION

En el área tropical húmeda de México, existen variedades nativas y mejoradas, de maíz con cierta resistencia a plagas y enfermedades y, además, con buenas características agronómicas y morfológicas. Sin embargo, esta riqueza de plasma germinal se encuentra dispersa, por lo que es necesario integrar esas características en una población para brindar respaldo a los programas de mejoramiento genético de maíz en el área.

¹ Recibido para publicación el 20 de junio de 1991.

El autor agradece al personal investigador y de campo del Programa de Maíz del Campo Experimental Cotaxtla, por su participación en la formación del material genético de esta investigación. Y, a los doctores Fidel Márquez Sánchez y Lauro Bucio Alanís, en las etapas de evaluación y análisis de la información contenida en este artículo.

Parte del trabajo fue presentada por el autor en la Tesis de Maestría en Ciencias, Colegio de Posgraduados, Chapingo, Méx.

* Investigador del Programa de Maíz. Campo Experimental de Cotaxtla, Veracruz, Méx. Actualmente realiza estudios de Doctorado en la Universidad de Nebraska, EE UU.

Se considera que, mediante la formación de compuestos de amplia base genética (CABG), es posible manejar y acumular un gran número de características deseables dentro de una población, y, por medio de una selección cíclica, incrementar la media de rendimiento de grano, así como la acumulación de genes favorables en otras características. Por otro lado existe abundante información que señala la necesidad de disponer de variabilidad genética y que apoya la formación de los CABG; no obstante, es de tipo descriptivo sin profundizar en lo que está sucediendo dentro de ese tipo de compuestos.

Por esas razones, en este trabajo, se analiza el comportamiento de un CABG de maíz tropical formado en Cotaxtla, mediante estimadores de variancias en y entre las familias que formaron el CABG en seis ciclos de recombinación.

REVISION DE LITERATURA

Las especies algámicas son poblaciones compuestas de subpoblaciones sometidas a diversas presiones de selección, en las cuales la migración ha sido variable. Cada subpoblación posee uno o más alelos favorables que están ausentes en otras. En la práctica, una aproximación conservadora que asegura la presencia de varios alelos favorables es establecer compuestos de amplia base genética (CABG), con la intervención de diversas fuentes germoplásmicas (1).

Sprague y Eberhart (6) y Hallauer y Miranda (2) indicaron que los CABG resultan del apareamiento aleatorio de las cruzas intervarietales posibles dentro de un grupo mezclado de variedades heterógenas –poblaciones o razas– y que han sido ampliamente usadas en el mejoramiento genético por su amplia variabilidad en ese sentido.

Gran parte del renovado interés por el mejoramiento genético de las poblaciones proviene de los estudios en genética cuantitativa en maíz, varios de los cuales han revelado que la variancia genética aditiva, para rendimiento y otros atributos en poblaciones heterocigóticas de maíz, es muy elevada y predominante (7).

Por su parte, Pandey *et al.* (4), al citar a varios autores, afirman que la magnitud de la variabilidad genética de las poblaciones ha demostrado que es función del número y de la diversidad genética de sus componentes, la cual se incrementa con su recombinación.

Por otro lado, Hallauer y Miranda (2) indican que, eventualmente, todos los miembros de una población cerrada llegarán a estar emparentados; el tiempo para que esto suceda depende del tamaño de la población. La endogamia se puede evitar, con más posibilidad, mediante recombinación; si el apareamiento es estrictamente al azar, es menor; pero debido al número de individuos que pueden ser incluidos razonablemente, la endogamia es inevitable. Agregan que la cantidad inevitable de endogamia, en una población bajo apareamiento aleatorio, está determinada por el número de individuos emparentados en ella, los cuales se unen al azar en todas las generaciones.

MATERIALES Y METODOS

Material genético

La formación del CABG se inició en el Campo Experimental de Cotaxtla en 1981. Se utilizaron 39 variedades de maíz sobresalientes en ensayos de rendimiento durante varios años y en localidades del trópico húmedo de México. De este grupo de variedades, las 20 más sobresalientes integraron un compuesto polinizador.

Durante seis ciclos, la siembra se realizó en un lote aislado de desespigamiento; se estableció un surco de 10 m con cada una de las 39 variedades alternadas con surcos del compuesto polinizador, en una relación 2:1. Se depositaron dos semillas cada 25 cm, con una distancia de 90 cm entre surcos; se usó una presión de selección del 7% en las variedades que integraron el compuesto polinizador y del 5% en el resto –dos y tres mazorcas en parcelas de 41 plantas.

En el periodo de llenado de grano, en cada ciclo, se marcaron dentro de cada variedad (hembra) plantas con competencia completa, sin acame, sanas, que tuvieran aproximadamente la altura media de la variedad y que fueran representativas de la misma. De las plantas marcadas, se seleccionaron las mejores mazorcas para sembrar los surcos-hembra del ciclo siguiente. De las variedades que intervinieron en la formación del compuesto polinizador, se seleccionó la mejor mazorca para integrar el compuesto macho del siguiente ciclo.

El proceso de selección se llevó a cabo durante seis ciclos, obteniéndose 39 variedades en cada uno. En la evaluación en campo participaron 39 materiales genéticos de cada ciclo, 39 variedades originales y siete

compuestos balanceados utilizados como polinizadores, lo que dio un total de 280 materiales genéticos. Aunque en cada generación se involucra la recombinación, la selección y la migración, en este trabajo se les llamará ciclos.

El CABG quedó integrado por dos subcompuestos: el primero que se denominará subcompuesto de machos, formado por las variedades que intervinieron en el compuesto polinizador del ciclo subsecuente, y el segundo formado por las variedades que intervinieron sólo como hembras dentro del CABG, al que se le denominará subcompuesto de hembras.

Evaluación en campo

El presente trabajo se realizó en el ciclo de temporal (secano), de 1984, en los campos experimentales de Cotaxtla, en Veracruz, y La Huerta, en Jalisco, Méx. Ambas localidades tienen un clima cálido, subhúmedo y una altura sobre el nivel del mar menor que 500 metros.

El material genético se evaluó, en ambas localidades, con un arreglo de tratamientos en parcelas divididas en un diseño experimental de bloques completos al azar, donde la parcela grande fue la variedad y las chicas los ciclos, con dos repeticiones por localidad. Se utilizaron modelos aleatorios con el fin de estimar las variancias entre variedades, con el supuesto de que eran una muestra representativa de una población de variedades de una población de variedades mejoradas.

Para ver si los materiales de cada variedad eran más parecidos a los de las otras variedades, conforme se avanzaba en el proceso de recombinación, se estimó la variancia en cada ciclo y localidad con base en los siguientes análisis:

| Fuente de variación | g. l. | c. m. | E (c. m.) |
|---------------------|-------|----------------|--------------------------|
| Repeticiones | 1 | | |
| Variedades | 39 | M ₁ | $\alpha^2 + r\alpha^2 v$ |
| Error | 39 | M ₂ | α^2 |
| Total | 79 | | |

r = repeticiones v = variedades l: localidades

El estimador de la variancia de variedades fue:

$$\alpha^2 v = \frac{M_1 - M_2}{r}$$

Con el mismo fin se realizaron análisis de variancia considerando ambas localidades de la manera siguiente:

| Fuente de variación | g. l. | c. m. | E (c. m.) |
|---------------------|-------|----------------|---|
| Localidades | 1 | | |
| Repetición (loc) | 2 | | |
| Variedades | 39 | M ₁ | $\alpha^2 + r\alpha^2 v l + r l \alpha^2$ |
| Loc x variedades | 39 | M ₂ | $\alpha^2 + r\alpha^2 v l$ |
| Error | 78 | M ₃ | α^2 |
| Total | 159 | | |

r = repeticiones v = variedades l = localidades

El estimador de la variancia de variedades en este caso fue:

$$\alpha^2 v = \frac{M_1 - M_2}{r l}$$

Esta variancia estimada de variedades se dividió entre la variancia respectiva del error, tal como lo propusieron Sprague y Federer (5):

$$m = \frac{\alpha^2 v}{\alpha^2}$$

También se hizo la estimación de la variancia dentro de las variedades a partir de las observaciones de plantas individuales, con el fin de detectar diferencias estadísticas entre ellas, aplicando la prueba de Bartlett sobre homogeneidad de variancias, descrita por Infante y Zárate (3).

En ambas localidades se registraron las siguientes variables: rendimiento en mazorca (kg · ha⁻¹), días a floración masculina al 50% de anthesis, días a floración femenina al 50% de aparición de estigmas. En La Huerta, se registraron también la fecha de floración femenina de cada planta, la altura de la planta desde la base del tallo hasta el ápice de la espiga en 10 plantas por parcela, la altura de mazorca desde la base del tallo hasta la base de la mazorca principal y el porcentaje de acame, contando el número de plantas acamadas en relación con el total por parcela.

RESULTADOS Y DISCUSION

Debido a que el CABG estaba estructurado por dos subcompuestos, se esperaba una reducción de las diferencias entre las variedades a medida que avanzaban los ciclos por causa del subcompuesto polinizador, el cual actuó como progenitor recurrente a través de los ciclos de selección. Con el fin de estimar tal variación, en el Cuadro 1 se presentan los valores de F para el factor variedades de los análisis de variancia de los caracteres: rendimiento, floración masculina y femenina, altura de planta y de mazorca, y porcentaje de acame en cada ciclo, en Cotaxtla y La Huerta. Se observa que los resultados por localidad difieren significativamente en algunos aspectos por ejemplo: en Cotaxtla, el rendimiento en los ciclos C_0 y C_3 presentó diferencias significativas en comparación con La Huerta, donde sólo en el C_0 no hubo diferencias estadísticas. Otros caracteres, que presentaron diferencias en comportamiento, fueron: floración masculina y femenina y porcentaje de acame, por lo que se puede decir que las variedades en estos caracteres tuvieron respuestas diferentes en cada ambiente, a diferencia de la altura de planta y de la mazorca, que mostraron respuestas similares en ambos. Lo anterior se explica a que en La Huerta las variedades tuvieron mayor rendimiento, mayor acame y fueron más precoces que en Cotaxtla.

A través de los ciclos (Cuadro 1), se aprecian discrepancias significativas en C_0 para todos los caracteres estudiados en ambos ambientes –con excepción

del rendimiento en La Huerta. A medida que se avanzó en los ciclos, las diferencias estadísticas fueron desapareciendo a tal grado que en C_6 sólo la altura de planta, en Cotaxtla, y el rendimiento y porcentaje de acame, en La Huerta, fueron significativos.

En el Cuadro 2 se presentan los valores de F, resultantes de los análisis de variancia combinados de ambas localidades para los caracteres estudiados. Se puede observar que en rendimiento, altura de planta y de mazorca se mantienen las diferencias estadísticas entre las variedades a través de los ciclos. En el resto de los caracteres, en el ciclo C_6 no se observaron desigualdades estadísticas, por lo que se puede inferir que la diferencia entre los materiales en los caracteres estudiados se redujo debido a la cruz a regresiva del subcompuesto de machos hacia el subcompuesto de hembras, y la selección y migración de ambos subcompuestos.

Al observar los ciclos en el Cuadro 2 se aprecia una respuesta similar al Cuadro 1; esto es, que a medida que avanzaron los ciclos las diferencias estadísticas tendieron a desaparecer en C_6 , por lo menos en las variables: días a floración masculina y femenina, y porcentaje de acame.

Respecto a la interacción de localidades por variedades sólo se obtuvo importancia estadística en algunos caracteres y ciclos. El rendimiento fue significativo en C_1 , C_2 y C_3 ; la altura de planta, en el C_2 ; y el porcentaje de acame, en el C_6 . Lo anterior indica que las variedades tuvieron una expresión diferente de los caracteres

Cuadro 1. Valores de F resultantes para el factor variedades de los caracteres estudiados en cada ciclo, en Cotaxtla y La Huerta (1984 B).

| Caracteres | Localidades | C_0 | C_1 | C_2 | C_3 | C_4 | C_5 | C_6 |
|-------------------|-------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| rendimiento | Cotaxtla | 1.79** | 1.56 | 1.17 | 1.83* | 0.72 | 1.33 | 1.27 |
| | La Huerta | 1.56 | 3.58** | 2.76** | 3.33* | 2.62** | 2.74** | 1.92* |
| flor ♂ | Cotaxtla | 2.32** | 1.60 | 1.72* | 1.19 | 1.19 | 1.72* | 1.15 |
| | La Huerta | 5.20** | 3.34** | 3.77** | 2.18** | 1.12 | 1.45 | 0.92 |
| flor ♀ | Cotaxtla | 2.56** | 1.73* | 1.15 | 1.18 | 1.29 | 1.26 | 0.97 |
| | La Huerta | 6.46** | 3.87** | 4.38** | 2.15** | 1.37 | 2.59** | 0.91 |
| altura de planta | Cotaxtla | 5.49** | 5.00** | 3.17** | 1.72* | 1.84* | 1.36 | 1.81* |
| | La Huerta | 3.08** | 1.50 | 3.18** | 1.76* | 1.89* | 1.83* | 1.14 |
| altura de mazorca | Cotaxtla | 4.14** | 5.31** | 1.94* | 1.45 | 1.54 | 1.56 | 1.61 |
| | La Huerta | 6.80** | 1.71** | 1.93* | 1.45 | 2.30** | 1.65 | 1.17 |
| acame (%) | Cotaxtla | 2.07* | 1.61 | 1.47 | 1.35 | 1.16 | 0.81 | 1.40 |
| | La Huerta | 2.16** | 1.61 | 0.98 | 2.60** | 1.51 | 1.21 | 2.27** |

** Altamente significativa al 0.01 de probabilidad (2.128)

* Significancia al 0.05 de probabilidad (1.70)

Cuadro 2. Valores de F de los factores variedades e Interacción Localidad x Variable en el combinado de localidades para los caracteres estudiados (1984 B).

| Caracteres | Factor | C ₀ | C ₁ | C ₂ | C ₃ | C ₄ | C ₅ | C ₆ |
|-------------------|------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| rendimiento | Variedades | 2.22** | 3.30** | 1.99* | 3.58** | 1.77* | 2.60** | 2.06** |
| | Loc x Var | 1.02 | 2.15** | 1.90* | 1.75* | 2.42* | 1.37 | 1.39 |
| flor ♂ | Variedades | 4.85** | 2.78** | 2.98** | 1.88** | 1.53 | 1.87* | 0.98 |
| | Loc x Var | 1.40 | 1.18 | 1.17 | 0.89 | 0.82 | 1.42 | 1.14 |
| flor ♀ | Variedades | 6.03** | 3.44** | 2.20** | 2.07** | 1.85* | 1.90** | 1.16 |
| | Loc x Var | 1.23 | 1.07 | 0.90 | 0.65 | 0.76 | 1.17 | 0.73 |
| altura de planta | Variedades | 7.00** | 4.34** | 4.52** | 2.32** | 2.41** | 1.81* | 2.08** |
| | Loc x Var | 1.36 | 0.89 | 1.82* | 1.14 | 1.30 | 1.17 | 1.17 |
| altura de mazorca | Variedades | 9.48** | 5.71** | 2.67** | 2.23** | 2.65** | 1.71* | 1.82* |
| | Loc x Var | 1.15 | 1.41 | 1.20 | 0.66 | 1.07 | 1.48 | 0.91 |
| acame (%) | Variedades | 3.45** | 2.08** | 1.26 | 2.38** | 1.19 | 1.03 | 1.61 |
| | Loc x Var | 0.78 | 1.17 | 1.08 | 1.48 | 1.44 | 0.96 | 2.07** |

* Significativo al 0.05**, 0.01 de probabilidad.

mencionados en cada uno de los ambientes estudiados, en los ciclos indicados.

Para cuantificar la reducción de la variación entre las variedades de cada ciclo, se usó el estimador de variancia de variedades y su relación con el error (m), como se describe en Materiales y Métodos. En el Cuadro 3 se presentan estimadores de variancia por ciclo, obtenidos de los análisis individuales de las dos localidades estudiadas y del análisis individual de las

dos localidades estudiadas y del análisis combinado en todos los caracteres. Se puede observar una reducción de estos estimadores de variancia del C₀ al C₆, siendo más clara ésta en las variables altura de planta y de mazorca. Esta reducción se debe a que al iniciar la integración del CABG en ambas localidades, en el C₀ existía una diferencia de 143 cm entre el material más alto y el más bajo, y en el C₆, esa diferencia sólo fue de 49 centímetros.

Cuadro 3. Estimadores de variancia de variedades a través de su relación con el error (m) de los caracteres estudiados en Cotaxtla, La Huerta y el combinado de ambas localidades (1984 B).

| | Rendimiento | | | Altura de planta | | | Altura de mazorca | | |
|----------------|-------------|-----------|-------|------------------|-----------|-------|-------------------|-----------|-------|
| | Cotaxtla | La Huerta | Comb. | Cotaxtla | La Huerta | Comb. | Cotaxtla | La Huerta | Comb. |
| C ₀ | 0.39 | 0.28 | 0.30 | 2.24 | 1.04 | 1.50 | 1.57 | 2.90 | 2.12 |
| C ₁ | 0.27 | 1.29 | 0.57 | 2.00 | 0.25 | 0.83 | 2.16 | 0.86 | 1.18 |
| C ₂ | 0.08 | 0.88 | 0.25 | 1.08 | 1.09 | 0.88 | 0.47 | 0.46 | 0.42 |
| C ₃ | 0.41 | 1.16 | 0.64 | 0.36 | 0.38 | 0.33 | 0.22 | 0.22 | 0.31 |
| C ₄ | 0 | 0.81 | 0.20 | 0.42 | 0.44 | 0.35 | 0.27 | 0.69 | 0.41 |
| C ₅ | 0.16 | 0.87 | 0.40 | 0.18 | 0.41 | 0.20 | 0.28 | 0.97 | 0.18 |
| C ₆ | 0.13 | 0.46 | 0.27 | 0.41 | 0.20 | 0.27 | 0.30 | 0.08 | 0.20 |

| | Días a flor | | | Días a flor | | | Acame (%) | | |
|----------------|-------------|-----------|-------|-------------|-----------|-------|-----------|-----------|-------|
| | Cotaxtla | La Huerta | Comb. | Cotaxtla | La Huerta | Comb. | Cotaxtla | La Huerta | Comb. |
| C ₀ | 0.29 | 2.10 | 0.96 | 0.78 | 2.64 | 1.26 | 0.53 | 0.58 | 0.61 |
| C ₁ | 0.30 | 1.16 | 0.44 | 0.36 | 1.60 | 0.61 | 0.30 | 0.32 | 0.27 |
| C ₂ | 0.36 | 1.39 | 0.49 | 0.08 | 2.02 | 0.30 | 0.23 | 0 | 0.06 |
| C ₃ | 0.09 | 0.59 | 0.22 | 0.09 | 0.68 | 0.27 | 0.17 | 0.40 | 0.36 |
| C ₄ | 0.09 | 0.06 | 0.13 | 0.14 | 0.22 | 0.21 | 0.08 | 0.76 | 0.05 |
| C ₅ | 0.36 | 0.22 | 0.22 | 0.13 | 0.56 | 0.22 | 0 | 0.10 | 0.01 |
| C ₆ | 0.07 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.01 | 0.70 | 0.63 | 0.15 |

En general, esta reducción en los estimadores de variancia de los caracteres a través de los ciclos, puede indicar que ambos subcompuestos tendieron a perder la identidad genética de las variedades, para integrarse en un solo compuesto; además, en el subcompuesto de hembras también perdieron su identidad genética por la migración producida.

Asimismo, se estimó la variabilidad dentro de las variedades en cada ciclo mediante la variancia de observaciones individuales de plantas en los caracteres floración femenina, altura de planta y de mazorca. En el Cuadro 4 se presentan las variancias dentro de las variedades, así como la prueba de Bartlett de homogeneidad de variancias. Al observarlas, en cada ciclo, se aprecia que la del C_0 fue mayor que en el resto debido a que gran parte de las variedades originales presentaban variabilidad entre y en ellas; lo mismo ocurrió con algunas poblaciones, variedades de polinización libre y "colectas". Esta variabilidad en días a floración femenina fue disminuyendo a través de los ciclos, lo cual se atribuye al desespigamiento practicado al 80% de la floración del compuesto polinizador, pues las plantas más tardías en su floración femenina se eliminaron automáticamente al no llenar completamente la mazorca. Con respecto a la prueba de Bartlett, practicada en floración femenina, ésta mostró que las variancias fueron estadísticamente diferentes al 1% de probabilidad.

Cuadro 4. Prueba de homogeneidad de las variancias estimadas a partir de plantas individuales en cada ciclo en La Huerta, Jal., y Campo Cotaxtla, Ver.

| | Días a flor | Altura de planta | Altura de mazorca |
|--------------|-------------|------------------|-------------------|
| $\chi^2 C_0$ | 11.96 | 1 750.1 | 1 120.4 |
| $\chi^2 C_1$ | 9.45 | 1 055.5 | 669.6 |
| $\chi^2 C_2$ | 9.11 | 1 110.3 | 676.0 |
| $\chi^2 C_3$ | 8.19 | 821.5 | 440.0 |
| $\chi^2 C_4$ | 7.98 | 819.0 | 446.2 |
| $\chi^2 C_5$ | 6.84 | 755.2 | 454.8 |
| $\chi^2 C_6$ | 8.06 | 611.3 | 295.3 |
| Bartlett | 105.32* | 149.66* | 229.40* |

1:0.01 - 16.81

Los caracteres altura de la planta y de la mazorca muestran una gran variación dentro del C_0 con respecto a los otros ciclos, lo cual se atribuye a la misma razón

apuntada en floración femenina; o sea, algunas variedades poseían gran variabilidad en y entre ellas, en el caso de las poblaciones, variedades de polinización libre y "colectas".

La disminución en la magnitud de la variancia en altura de la planta y de la mazorca se atribuyó principalmente a las siguientes causas: a) las plantas seleccionadas en cada ciclo debían estar alrededor de la altura media de la variedad por seleccionar; b) en el compuesto polinizador fueron desespigadas las plantas demasiado altas con respecto al mismo; c) algunas variedades del compuesto macho eran de porte bajo y, al cruzarse con variedades altas, proporcionaron al CABG un porte de planta intermedio, tendiendo en cada ciclo a la uniformidad. Respecto a la prueba de Bartlett en estos caracteres, en el Cuadro 4 se observa que las variancias fueron estadísticamente diferentes al 1% de probabilidad.

En síntesis, la información anterior está indicando que el CABG fue integrado en una sola población en seis ciclos, al aumentar el parecido entre y en las variedades.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados alcanzados se concluyó lo siguiente:

- En Cotaxtla y La Huerta, las variedades mostraron diferentes respuestas a la selección en los caracteres: rendimiento, floración masculina y femenina, y porcentaje de acame; además mostraron una respuesta similar en altura de la planta y de la mazorca.
- Las diferencias entre las variedades en cada localidad tendieron a reducirse a medida que se avanzó en los ciclos de selección; a través de localidades sólo el porcentaje de acame y días de floración masculina y femenina mostraron esa tendencia.
- La interacción entre variedades y localidades se manifestó en algunos ciclos de selección en el rendimiento, altura de planta y porcentaje de acame.
- Los estimadores de variancia por medio de su relación con el error mostraron claras tendencias de disminución a través de los ciclos de selección.

— Las variancias dentro de las variedades fueron diferentes en los ciclos de selección en los caracteres: floración femenina, altura de planta y de mazorca, mostrando una tendencia a reducirse a medida que avanzó la selección.

LITERATURA CITADA

1. COMSTOCK, E.R. 1978. Quantitative genetics in maize breeding. In *Maize breeding and genetics*. B.D. Walden (Ed). N.Y., Wiley. p. 191-206.
2. HALLAUER, R.A.; MIRANDA, J.B. 1981. *Quantitative genetics in maize breeding*. Ames, EE.UU., Iowa State University Press. 468 p.
3. INFANTE, G.S.; ZARATE, G.P. 1984. Métodos estadísticos Méx., Trillas. p. 348-51
4. PANDEY, S.; VASSAL, S.K.; DE LEON, C.; ORTEGA, A.; GRANADOS, G.; VILLEGAS, F. 1982. Desarrollo y mejoramiento de poblaciones de maíz Méx., CIMMYT. 35 p. Presentado en: Reunión de Maiceros de la Zona Andina (1982, Santa Cruz, Bol)
5. SPRAGE, G.F.; FEDERER, W.T. 1951. A comparison of variance components in corn yield trials II. Error, year x variety, location x variety, and variety components *Agronomy Journal* 43:535-541.
6. SPRAGE, G.F.; EBERHART, S.A. 1977. Corn breeding. In *Corn and corn improvement*. G.F. Sprague (Ed.) Madison, Wis., EE.UU., American Society of Agronomy p. 305-362
7. VASAL, S.K.; ORTEGA, A.; PANDEY, S. 1983. Programa de manejo, mejoramiento y utilización de germoplasma de maíz en el CIMMYT El Batán, Méx., Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. 26 p.

Método de Laboratório para Avaliação da Resistência Genética de *Coffea* spp. a *Perileucoptera coffeella*¹

O. Guerreiro Filho*, H.P. Medina Filho**, A. Carvalho**

ABSTRACT

A leaf disc method was developed to evaluate the resistance of *Coffea* germplasm to coffee leaf miner (*Perileucoptera coffeella*). Leaf discs 3.14 cm in diameter were kept on moist sponge inside plastic boxes closed with a glass lid. The boxes were maintained under artificial light at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ with a photoperiod of 12 hours. Each box held 144 leaf discs. Uniform disk infestations were obtained by the introduction of 150 pupae per box. Contrary to what occurred in field conditions, where the first and second leaf pairs were the least infested, in the laboratory no insect preference for any leaf pair was observed. Presence of mid-ribs in the discs did not influence lesion development. Under both field and lab conditions, the *Coffea racemosa* x *C. arabica* derivative C1195-5-6-2 showed high resistance. The genetic resistance of this plant can be expressed as the F_1 generation of a cross with a susceptible cultivar. In this generation, segregation occurred in ratios compatible with the hypothesis of resistance being inherited as a single dominant trait. The reliability of the devised lab method, as evidenced by high correlations with field tests in addition to its other advantages, suggests its routine use as a screening method in breeding programs. A practical strategy for evaluation of large segregant populations is also proposed.

Palavras chaves: *Coffea* spp., *Perileucoptera coffeella*, bicho mineiro, resistência, seleção precoce.

INTRODUÇÃO

A primeira referência sobre a ocorrência do bicho mineiro no Brasil, deu-se em 1860 em cafezais do Rio de Janeiro e São Paulo, ocasionando notável decréscimo na produção (22). Como a ocorrência da ferrugem (*Hemileia vastatrix* Berk. e Br.) a

RESUMO

Desenvolveu-se um método de avaliação da resistência de *Coffea* à *Perileucoptera coffeella* através da exposição de discos de folhas a essa praga. Discos de 3.14 cm² são mantidos em caixas plásticas sobre espuma plástica umedecida e cobertas com vidro, por onde incide luz artificial. As caixas, em laboratório são mantidas à temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. Em caixas com 144 discos dispostos em parcelas formadas por 12 discos, uma distribuição uniforme da infestação é obtida com uma população de insetos oriunda de 150 crisálidas. Observou-se, em laboratório, não haver preferência do inseto pelo par de folhas amostrado. Ao contrário, a nível de campo, o primeiro e segundo pares a partir da extremidade dos ramos, são menos atacados. A nervura central não exerceu influência no desenvolvimento das lesões. Parcelas formadas por discos com ou sem nervura central foram igualmente danificadas. Derivado da hibridação interespecífica entre *C. arabica* e *C. racemosa*, o cafeeiro C1195-5-6-2 mostrou-se altamente resistente, tanto em laboratório como a nível de campo. A resistência do cafeeiro C1195-5-6-2 é expressa em alguns indivíduos oriundos de cruzamentos dessa planta com cafeeiros suscetíveis, indicando a possibilidade de transferir essa característica para outros germoplasmas. Na geração F_1 , ocorre segregação para resistência em proporções que corroboram a hipótese de herança simples dominante para resistência. A confiabilidade do método de laboratório desenvolvido, evidenciada pela alta correlação com dados de campo, associada às grandes vantagens de sua utilização, sugere a seu emprego rotineiro em programas de melhoramento para resistência ao bicho mineiro. Indica-se também, uma estratégia prática para a seleção em populações segregantes.

partir de 1970, verificou-se uma mudança na tecnologia de aplicação de defensivos e uma drástica alteração no sistema de condução da cultura cafeeira que, juntamente com o uso inadequado de defensivos, causaram desequilíbrios biológicos desastrosos para a cultura (19). De ocorrência apenas nos períodos secos do ano, passou então a se constituir também em problema nos períodos chuvosos, sendo hoje considerada a principal praga do cafeeiro no Brasil (18).

Os prejuízos na produção, causados em algumas localidades chegam a até 50% (1), como consequência da redução na superfície foliar fotossintetizadora das plantas, causadas pelas galerias formadas pelas lagartas e principalmente pela queda prematura das folhas (5, 16).

¹ Recebido para publicação el 18 de março de 1992
Parte de Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Biologia da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas

* Seção de Genética, Instituto Agronômico (IAC) Caixa Postal 28, 13 001, Campinas, SP, Bra. Com bolsa de pesquisa do CNPq, Bra.

Tem-se realizado o combate o bicho mineiro exclusivamente com produtos químicos, aumentando o custo de produção e contribuindo para tornar o café menos competitivo com outras culturas. Além disso, excessivas aplicações de inseticidas poluem o meio ambiente, constituindo uma ameaça à saúde humana.

Diversos fatores estimulam o desenvolvimento de cultivares resistentes ao bicho mineiro. No gênero *Coffea* nota-se uma grande variabilidade genética em relação à resistência. A praga é de importância primária e ocorre em níveis populacionais altíssimos nas principais regiões produtoras. O café é cultivado em grandes áreas, é perene e o inseto possui elevado número de inimigos naturais os quais, aliados a cultivares resistentes, reduziram a infestação, mantendo-a abaixo da faixa de dano econômico.

Em observações realizadas no Brasil a espécie mais suscetível ao bicho mineiro parece ser *Coffea arabica* L. Todas as variedades dessa espécie são severamente atacadas. No entanto, acentuada variabilidade quanto ao grau de infestação entre as espécies silvestres diplóides de *Coffea* foi observada por Medina Filho et al. (13). Os exemplares *C. eugenioides*, *C. dewevrei*, *C. racemosa*, *C. liberica* e *C. kapakata* da coleção de espécies de Campinas, apresentam reduzida porcentagem de folhas atacadas, enquanto *C. stenophylla* mostra-se praticamente imune. *C. canephora* e *C. congensis* revelam-se suscetíveis. As espécies *C. salvatrix* e *C. brevipes* são também altamente resistentes quando comparadas aos cultivares Catuaí Vermelho e Mundo Novo de *C. arabica* (8).

A resistência ao bicho mineiro presente em algumas das espécies diplóides vem sendo transferida para *C. arabica*, com o objetivo de se desenvolver cultivares resistentes a essa praga. Tem-se dado especial ênfase à espécie *C. racemosa*. A metodologia de seleção de plantas resistentes, até o presente momento, baseia-se na identificação de indivíduos pouco atacados em condições de campo e tem-se verificado que a resistência assim identificada é geneticamente controlada, podendo ser transferida a outros germoplasmas (7, 14). No presente trabalho desenvolveu-se uma metodologia de seleção precoce de cafeeiros para resistência ao bicho mineiro e indicam-se as correlações existentes entre essa seleção precoce e as avaliações durante vários anos a nível de campo, em plantas adultas.

MATERIAL E MÉTODOS

Criação artificial do inseto em laboratório

A criação do bicho mineiro foi desenvolvida, objetivando-se a produção constante de crisálidas para utilização nos testes de resistência do germoplasma em estudo. Utilizou-se a técnica descrita por Katiyar e Ferrer (10) com algumas adaptações.

Gaiolas de madeira revestidas com tela de malha fina, com dimensões de 70 x 70 x 70 cm e suspensas a 60 cm do solo, foram utilizadas na criação do inseto. A parte posterior das gaiolas apresenta uma pequena porta pela qual os insetos são introduzidos e, na parte inferior, um fundo falso que, podendo ser removido, permite a introdução de mudas de diferentes tamanhos em seu interior.

A criação foi mantida em laboratório como fotoperíodo de 14 horas, temperatura de $27 \pm 3^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $70 \pm 10\%$, condições que, segundo Parra (19), favorecem uma redução na duração do ciclo biológico do inseto.

Após a postura, a cada dois dias, as mudas foram substituídas por outras, isentas de dano, e mantidas, posteriormente, em condições ambientais idênticas às descritas anteriormente, para que as demais fases do desenvolvimento do inseto, pudessem ter continuidade.

Os adultos foram alimentados com solução de sacarose a 10%, que, de acordo com Nantes e Parra (17), proporciona um aumento no número e na viabilidade dos ovos, além de maior longevidade das mariposas.

Viabilidade das crisálidas

A viabilidade das crisálidas foi determinada antes de sua utilização como fonte de infestação nos testes de laboratório, através da porcentagem de emergência dos adultos.

Posição e tamanho das parcelas e da população do inseto

Adaptou-se a metodologia descrita por Eskes (6) para o estudo da resistência do cafeeiro à ferrugem, *H.*

vastatrix. Com um furador de rolhas de 2.0 cm de diâmetro, obtiveram-se discos, de folhas coletadas no período da manhã. Esses discos, com a epiderme superior voltada para cima, foram colocados sobre uma espuma umedecida e mantida no interior de caixa de polietileno de 39 x 28 x 10 cm. Para garantir uma boa vedação, colocou-se nos bordos da caixa uma guarnição de espuma plástica sobre a qual colocou-se um vidro plano e transparente de 3 mm de espessura, impedindo a saída dos insetos e mantendo a umidade no interior da caixa. Em cada caixa colocaram-se sobre a espuma plástica 144 discos de folhas, em dois lotes de 72 discos, divididos por uma placa de isopor sobre a qual foram depositadas crisálidas obtidas da criação descrita

anteriormente. Havendo emergência dos adultos e estando os mesmos confinados à caixa, a oviposição era feita nos discos de folhas.

Após esse desenvolvimento inicial e, notando-se que o sistema era promissor, instalou-se um experimento para poder definir a população do inseto (50, 100 ou 150 crisálidas) e o número de discos de folhas por parcela (4, 6, 8 ou 12 discos), que resultasse em uma infestação uniforme. Em cada caixa contendo 144 discos poder-se-ia considerar 36 de 4, 24 de 6, 18 de 8 ou mesmo 12 parcelas de 12 discos cada uma, conforme mostra a Figura 1.

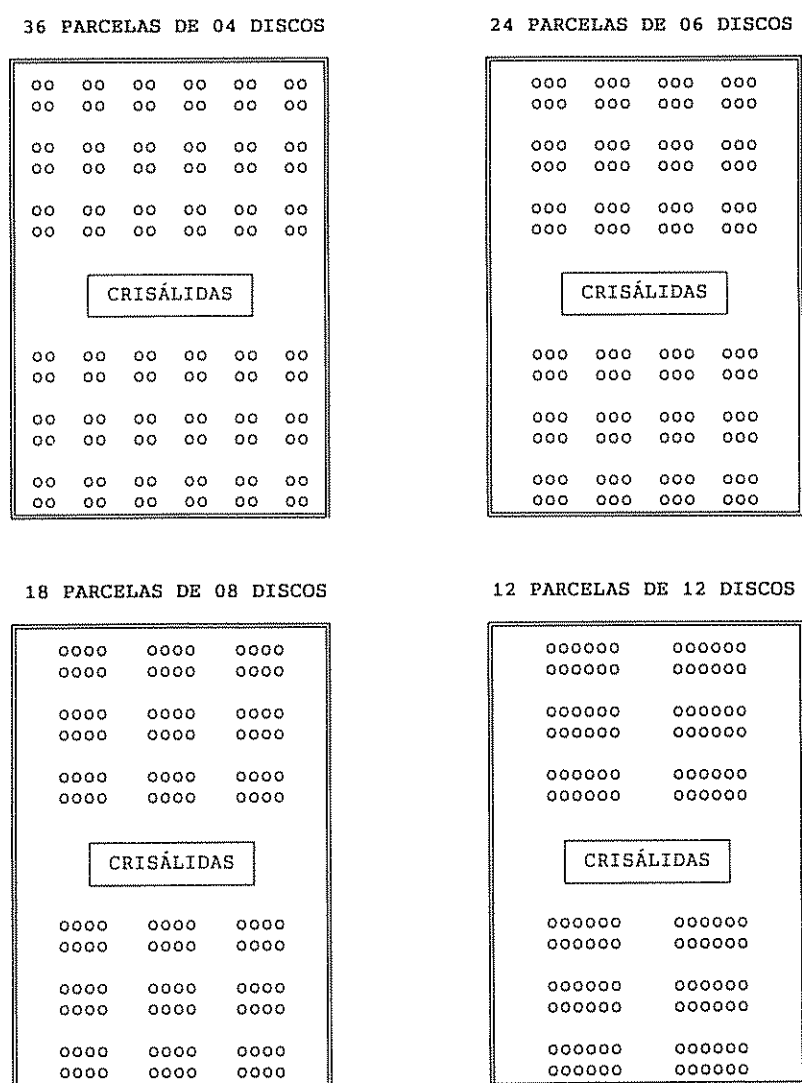


Fig. 1. Representação esquemática do número e da distribuição de possíveis parcelas em uma mesma caixa de testes de acordo com o número de discos considerado por parcela

O experimento foi mantido em laboratório com temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. Cada associação da população do inseto (PI)-número de discos por parcela (NDP)-número de parcelas (NP), foi analisada separadamente usando-se, para tanto, o delineamento estatístico de blocos ao acaso como quatro repetições, cada caixa representando uma repetição. Em todas as associações testadas, os 144 discos de cada caixa foram obtidos de folhas de uma única linhagem de *C. arabica*, suscetível, Catuaí Vermelho (CH2077-2-5-81). Posteriormente, testou-se a homogeneidade das variâncias obtidas em cada um dos experimentos pelo teste de Bartlett (21).

Os seguintes parâmetros foram analisados:

- Número de ovos por parcela (NO);
- número de discos lesionados por parcela (DLP);
- nota visual (NV) (pontos atribuídos segundo uma escala de 0 a 9, sendo 0= ausência de infestação e 9= parcela totalmente destruída) e
- área foliar danificada por parcela (ADP).

Para realização da análise estatística dos dados, NO foi transformado em $\sqrt{X+0.5}$ e os demais parâmetros em $\text{arc sen } \sqrt{\%}$. Foram também determinados os coeficientes de variação de cada associação PI-NDP-NP.

Influência da nervura central (NC)

Para determinar a influência da NC no desenvolvimento da lesão, realizou-se um experimento em blocos ao acaso com seis tratamentos, quatro repetições e seis discos de folhas por parcela. Os tratamentos foram constituídos da seguinte forma: a) todos os seis discos de folhas com NC; b) apenas cinco discos com NC; c) somente quatro discos com NC; d) apenas três discos com NC; e) somente dois discos com NC; e f) todos os seis discos sem NC.

A população utilizada para infestação foi de 150 crisálidas por caixa e os parâmetros considerados nas avaliações foram NV e DLP. Os dados foram transformados em $\text{arc sen } \sqrt{\%}$ para a análise estatística dos resultados.

Influência do par de folhas (PF)

Uma possível influência do PF no comportamento do inseto foi determinada em laboratório utilizando-se o método de infestação em discos de folhas. O delineamento

estatístico adotado foi o de blocos ao acaso com quatro repetições e seis tratamentos com seis discos por parcela. Cada tratamento esteve representado por um PF do primeiro ao sexto do ramo, a partir do mais recente. A população do inseto foi de 150 crisálidas por caixa e os parâmetros observados foram NO, DLP, NV e ADP. A nível de campo, foram marcadas 10 plantas do cultivar Catuaí e 5 ramos foram observados mensualmente quanto à infestação nos diferentes pares de folhas. O parâmetro observado foi o número de lesões presentes em cada PF. Os resultados foram transformados em $\sqrt{X+0.5}$ e analisados estatisticamente, sendo posteriormente testada a correlação com os resultados obtidos em laboratório.

Avaliação da geração parental e F1 de cruzamentos entre *C. arabica* e C1195-5-6-2

O cafeeiro C1195-5-6-2, descendente de um cruzamento natural entre *C. arabica* e *C. racemosa*, foi identificado por Medina Filho *et al.* (12) como resistente ao bicho mineiro e inúmeras hibridações foram realizadas com essa fonte de resistência e exemplares selecionados de cultivares de *C. arabica*. Entre essas hibridações, foi analisada em laboratório, apenas uma combinação híbrida, do cafeeiro C1195-5-6-2 (P₁) e H4782-7-882 (P₂). Desse cruzamento, foram obtidos 18 descendentes que faziam parte do ensaio de progênie (EP) 221 da Seção de Genética do Instituto Agrônomo do Campinas. Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado com 12 repetições e parcelas de seis discos de folhas, tendo como tratamentos P₁ e P₂. A população de insetos utilizada foi de 150 crisálidas.

Os parâmetros observados foram NO, NV, DLP e ADP. Acompanhou-se também o desenvolvimento da lesão em um disco, resultante da eclosão de um ovo, sendo estudado seis discos por genótipo. Discos de folhas dessas plantas juntamente com os tipos parentais, repetidos três vezes, constituíram os 24 tratamentos do teste de livre escolha realizado. As parcelas foram representadas por 6 discos segundo delineamento em blocos ao acaso com quatro repetições. Cada bloco foi infestado com 150 crisálidas. Para a análise estatística dos dados, os parâmetros ADP, DLP e NV foram transformados em $\text{arc sen } \sqrt{\%}$ e NO em $\sqrt{X+0.5}$. As médias foram comparadas através do teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para a geração F₁, analisou-se a correlação entre os valores obtidos para discos de folhas em laboratório e os valores obtidos em condições de campo, no intuito de se avaliar a eficiência do método de seleção desenvolvido. No campo, o nível de resistência foi determinado atribuindo-se pontos, segundo uma

escala de notas de 1 a 10, onde 1 significa ausência total de ataque e 10, ataque muito severo. Realizaram-se três observações anuais em época de alta intensidade de ataque. Seis discos de folhas de cada indivíduo da geração F_1 , apresentando um ovo por disco, foram mantidos em caixas de testes. Após o completo desenvolvimento das lagartas, determinado pela transformação em crisálidas, as lesões foram recortadas e sua área determinada em um integrador de área foliar.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Viabilidade das crisálidas

A emergência de adultos foi de 93%. Consequentemente utilizando-se 150 crisálidas como fonte de infestação, a população de insetos adultos foi de 139.5, com 100 crisálidas, população de 93 adultos e, com 50 crisálidas 46.5 adultos.

Em experimentos conduzidos em laboratório em temperaturas de 20, 27, 30 e 35°C, Parra (19) constatou haver emergência de igual número de machos e fêmeas em todas as temperaturas estudadas, sendo seus dados muito próximos aos obtidos por Speer (20) através da contagem de machos e fêmeas emergentes de crisálidas colhidas no campo e em várias gerações obtidas durante um ano em laboratório. Assim, supõe-se que metade de cada uma das populações seja representada por fêmeas de mesma idade, com semelhante capacidade de postura.

Pode-se verificar que a média geral de postura nos vários experimentos foi de 10.02 ovos por fêmea. Parra (19), avaliando a capacidade de postura de fêmeas que receberam ou não alimento (sacarose 10%), verificou que fêmeas não alimentadas colocaram 6.2 e 18.5 ovos nas temperaturas de 20°C e 27°C respectivamente, enquanto que fêmeas que receberam alimento colocaram 3.2 e 56.8 nas temperaturas acima referidas. Nas condições do experimento aqui relatado, os insetos adultos não receberam alimentação artificial e, como mencionado anteriormente, a temperatura no laboratório foi mantida a $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Dessa forma pode-se observar que o número médio de ovos por fêmea variou de 6.22 a 15.42, aproximando-se dos valores citados por Parra (19).

Posição e tamanho das parcelas e da população do inseto

Em estudos de resistência de plantas a insetos, o espaço disponível aos insetos condiciona o número de

indivíduos a ser liberado (11). Para insetos criados à temperatura de 20°C, humidade relativa próxima à saturação e fotoperíodo de 14 horas, Parra (19) observou 78.7% de viabilidade de crisálidas, 92.9% de viabilidade dos ovos e média de 6.2 ovos por fêmea não alimentada. Utilizando-se como exemplo esses dados, pode-se concluir que de um total de 100 crisálidas, 78.7 seriam viáveis. Dessas, 39.35 seriam fêmeas, capazes de colocar 243.97 ovos, dos quais 226 seriam viáveis, sendo esse o número aproximado de lagartas a infestar os discos de folhas, originadas da população inicial de 100 crisálidas.

Cada lagarta de *P. coffeella* danifica 1.15 cm² de área foliar no cultivar Catuai de *C. arabica* (15). Nas mesmas condições ambientais descritas anteriormente, 226 lagartas destruiriam 259.9 cm² de área foliar. A viabilidade média das crisálidas foi de 94%. Hipoteticamente, guardadas as proporções dos experimentos realizados por Parra (19) e Nantes e Parra (15), para que fosse danificado 1/3, 2/3 e toda a área foliar de 452.16 cm² equivalente aos 144 discos de folhas do cultivar Catuai Vermelho (H2077-2-5-81) presentes em uma caixa, seriam necessárias respectivamente de 50, 100 e 150 crisálidas. Pelo teste de Bartlett, pode-se verificar que as variâncias dos experimentos são heterogêneas ($X^2(N0)=424.30$; 11GL; $P>0.01$; $X^2(NV)=94.80$; 11GL; $P>0.01$; $X^2(DLP)=147.64$; 11GL; $P>0.01$ e $X^2(ADP)=206.70$; 11GL; $P>0.01$).

Dessa forma a identificação do tamanho ideal das parcelas e da população do inseto foi realizada com base nos menores coeficientes de variação apresentados pelos experimentos, uma vez que as médias experimentais, variaram muito entre os diferentes níveis populacionais e também entre as parcelas de diferentes tamanhos. Pode-se notar que o aumento na densidade populacional e no tamanho das parcelas, esteve associado a um aumento nas médias dos parâmetros NO, DLP e ADP. Apenas a NV que se trata de um parâmetro subjetivo que é atribuído às parcelas considerando o dano proporcional à área foliar existente, não refletiu essa tendência. Para esse parâmetro a escolha dos melhores níveis de tamanho populacional e de parcelas, poderia ter sido determinado diretamente pela variância. Pode-se notar que o coeficiente de variação decresceu à medida que se aumentou a densidade populacional do inseto. Para uma mesma densidade, o coeficiente de variação decresceu com o aumento do tamanho das parcelas (Quadro I).

Quadro 1. Médias (x), variâncias (s²) e coeficientes de variação (CV) em porcentagem obtidos nas análises de variâncias realizadas individualmente para cada associação população do inseto-número de discos por parcela-número de tratamentos, para os parâmetros número de ovos (NO), discos lesionados por parcela (DLP), nota visual (NV) e área danificada por parcela (ADP).

| População do Inseto | Discos por parcela | Tratamento (parcelas) | NO | | | DLP | | |
|---------------------|--------------------|-----------------------|-------|----------------|----|------|----------------|----|
| | | | x | s ² | CV | x | s ² | CV |
| n° | n° | n° | n° | % | n° | % | | |
| | 4 | 36 | 4.38 | 18.02 | 97 | 1.67 | 1.41 | 71 |
| 50 | 6 | 24 | 6.46 | 30.19 | 85 | 2.51 | 2.92 | 68 |
| | 8 | 18 | 8.70 | 49.62 | 81 | 3.23 | 4.42 | 65 |
| | 12 | 12 | 9.03 | 75.13 | 96 | 4.91 | 9.56 | 63 |
| | | | | | | | | |
| 100 | 4 | 36 | 13.54 | 132.35 | 85 | 2.92 | 1.43 | 41 |
| | 6 | 24 | 20.26 | 275.97 | 82 | 4.37 | 2.76 | 38 |
| | 8 | 18 | 27.77 | 445.35 | 76 | 5.80 | 4.36 | 36 |
| | 12 | 12 | 40.93 | 797.40 | 69 | 8.69 | 9.26 | 35 |
| 150 | 4 | 36 | 17.80 | 129.82 | 64 | 3.22 | 1.05 | 32 |
| | 6 | 24 | 26.50 | 212.48 | 55 | 4.88 | 1.87 | 28 |
| | 8 | 18 | 35.98 | 323.17 | 50 | 6.47 | 2.41 | 24 |
| | 12 | 12 | 52.70 | 489.93 | 42 | 9.70 | 3.76 | 20 |

| População do Inseto | Discos por parcela | Tratamento (parcelas) | NO | | | DLP | | |
|---------------------|--------------------|-----------------------|--------|----------------|----|-----------------|----------------|----|
| | | | x | s ² | CV | x | s ² | CV |
| n° | n° | n° | pontos | | % | cm ³ | | % |
| | 4 | 36 | 3.55 | 6.55 | 72 | 3.21 | 9.71 | 97 |
| 50 | 6 | 24 | 3.56 | 5.85 | 68 | 4.77 | 20.99 | 96 |
| | 8 | 18 | 3.78 | 4.80 | 58 | 6.51 | 29.88 | 84 |
| | 12 | 12 | 3.72 | 4.82 | 59 | 9.64 | 57.96 | 79 |
| | | | | | | | | |
| 100 | 4 | 36 | 6.19 | 6.75 | 42 | 8.47 | 17.95 | 50 |
| | 6 | 24 | 6.16 | 6.08 | 40 | 12.42 | 35.54 | 48 |
| | 8 | 18 | 6.52 | 5.51 | 36 | 16.78 | 59.58 | 46 |
| | 12 | 12 | 6.32 | 4.35 | 33 | 24.98 | 120.82 | 44 |
| 150 | 4 | 36 | 6.95 | 4.95 | 32 | 9.70 | 12.20 | 36 |
| | 6 | 24 | 6.96 | 4.07 | 29 | 14.41 | 19.94 | 31 |
| | 8 | 18 | 6.97 | 3.04 | 25 | 19.83 | 26.59 | 26 |
| | 12 | 12 | 7.00 | 1.77 | 19 | 29.39 | 31.20 | 19 |

Assim, em uma população de 50 crisálidas em delineamento constituído por 36 parcelas de 4 discos por parcela (repetição), os coeficientes de variação observados foram de 97, 71, 72 e 97% respectivamente para NO, DLP, NV e ADP. Já com populações de 150 crisálidas e delineamentos formados por parcelas de 12 discos, para os mesmos parâmetros, os coeficientes de variação foram de 42, 20, 19 e 19%, respectivamente.

Nos experimentos realizados para a determinação do tamanho ideal da população de *P. coffeella* por caixa, utilizou-se apenas um genótipo, altamente suscetível, podendo-se dessa forma identificar possíveis preferências do inseto por oviposições em diferentes regiões das caixas de testes. A população de 150 crisálidas, definida como a mais eficiente, a julgar pela mais intensa e uniforme distribuição, foi utilizada posterior-

mente para avaliar o efeito do PF, NC e o nível de resistência dos diferentes parentais utilizados.

Influência da NC

A NC presente nos discos de folhas não teve influência nem em DLP, nem na NV atribuídas às lesões (Quadro 2). O número de discos lesionados por parcela, foi maior (5.25) naquela formada por 5 discos com e 1 disco sem NC. A parcela formada apenas por discos sem NC apresentou 3.5 discos lesionados, mas ambas não diferiram estatisticamente. O mesmo foi observado em relação ao desenvolvimento das lesões.

Quadro 2. Influência da nervura central (NC) no desenvolvimento da lesão provocada por *P. coffeella*, avaliada pelos parâmetros discos lesionados por parcela (DLP) e nota visual (NV). Teste de F a 5% não significativo.

| Discos com NC/Discos sem NC | DLP | NV |
|-----------------------------|------|--------|
| n° | n° | pontos |
| 6/1 | 4.50 | 5.00 |
| 5/1 | 5.25 | 7.00 |
| 4/2 | 5.00 | 6.75 |
| 3/3 | 4.00 | 6.50 |
| 2/4 | 3.50 | 5.25 |
| 0/6 | 3.50 | 5.00 |

Esses resultados de certa forma são concordantes com os de Cardenas (3), que, investigando a resistência de seis germoplasmas de *Coffea* ao bicho mineiro, verificou que o número de nervuras secundárias não tem relação com a magnitude do dano causado. *C. stenophylla* e *C. arabica* var. Mokka que possuem menos nervuras secundárias, foram os genótipos com maior menor resistência respectivamente.

Verificou-se durante o experimento que, com a eclosão de apenas um ovo em discos apresentando NC, a lagarta resultante se alimentava da área de apenas um dos lados da nervura não a ultrapassando.

Efeito do PF

Pelo Quadro 3, observa-se que, em laboratório, a resposta dos seis PF testados foi semelhante para os quatro parâmetros estudados. O sexto PF foi o que apresentou o maior número de ovos (26.4) porém não diferindo estatisticamente de menor média, obtida no quarto PF (15.5). Os demais pares apresentaram valo-

res intermediários. Da mesma forma, não se obtiveram diferenças estatísticas significativas quanto a DLP, NV e ADP para os diferentes PF.

Quadro 3. Influência do par de folhas nos testes de infestação de *P. coffeella* em laboratório, avaliada através dos parâmetros, número de ovos (NO), discos lesionados por parcela (DLP), nota visual (NV) e área danificada por parcela (ADP). Teste F a 5% de probabilidade não significativo.

| Par de folhas | NO | DLP | NV | ADP |
|---------------|------|------|--------|-----------------|
| | n° | n° | pontos | cm ² |
| Primeiro | 22.0 | 5.03 | 5.26 | 11.15 |
| Segundo | 21.6 | 5.03 | 5.28 | 11.49 |
| Terceiro | 23.4 | 5.24 | 6.04 | 13.75 |
| Quarto | 15.5 | 4.84 | 5.81 | 12.25 |
| Quinto | 19.6 | 4.77 | 4.74 | 10.44 |
| Sexto | 26.4 | 4.53 | 4.74 | 10.10 |

A nível de campo, porém, os resultados foram diferentes. Avaliando-se a infestação pelo número de lesões presentes em cada um dos seis PF, observou-se que o primeiro e o segundo par foram menos atacados, com médias de 0.29 e 0.35 lesões respectivamente. O terceiro par, com 3.94 lesões, foi o mais atacado, seguido do quarto, quinto e sexto pares com respectivamente 3.30, 3.09 e 2.77 lesões. Para os parâmetros estudados, não houve correlação significativa entre a avaliação feita no campo e a realizada em laboratório, como se pode observar no Quadro 4. Isso seria esperado a julgar pelos resultados individuais das duas avaliações. Os resultados obtidos no campo corroboram observações de alguns autores, segundo os quais, folhas do primeiro e segundo par são menos atacadas (2, 15). Cardenas (3) constatou que em folhas do primeiro e segundo pares as minas eram menores e irregulares. Bigger (2) também ressalta a maior mortalidade de lagartas e o reduzido tamanho e fecundidade das mariposas em folhas novas.

Quadro 4. Coeficientes de correlação (r) entre o número de lesões por par de folhas (L.PF) em condições de campo e os parâmetros, número de ovos (NO), discos lesionados por parcela (DLP), nota visual (NV) e área danificada por parcela (ADP) obtidos em testes de laboratório.

| Parâmetros | r | 5%(4GL) |
|------------|------|--------------|
| L.PF/NO | 0.16 | 0.32; P<0.05 |
| L.PF/DLP | 0.60 | 1.50; P<0.05 |
| L.PF/NV | 0.09 | 0.18; P<0.05 |
| L.PF/ADP | 0.14 | 0.24; P<0.05 |

Parece portanto haver concordância entre os trabalhos citados e os dados obtidos com relação à menor intensidade de ataque dos insetos em folhas mais jovens em condições de campo. Nos testes em laboratório porém, isso não se verifica, onde os discos de folhas jovens são igualmente atacados, chegando a ser em casos extremos, completamente destruídos.

Esses resultados sugerem que a preferência do inseto pelos PF mais velhas a nível de campo, parece estar relacionada a fatores outros e não devido a coloração ou presença de substâncias deterrentes. Talvez a maior exposição solar das folhas jovens em condições de campo, reduza a preferência do inseto. Folhas adultas, localizando-se mais no interior da planta, estariam mais protegidas dos ventos, da insolação excessiva e até mesmo, menos expostas aos inimigos naturais. Embora essas hipóteses sejam meramente especulativas e o assunto deva ser melhor investigado, a menor infestação das folhas mais novas, certamente, não é uma característica genética que possa ser também expressa em folhas adultas como sugere Bigger (2).

Avaliação da geração parental e F₁ de cruzamentos entre *C. arabica* e C1195-5-6-2

Diversas hibridações têm sido realizadas entre cultivares selecionados de *C. arabica* (Catuaí, Mundo Novo e Icatu) com indivíduos classificados como resistentes ao bicho mineiro a nível de campo. Desses cruzamentos, procurou-se estudar a resistência de H4782-7-882, e C1195-5-6-2, bem como na progênie F1, H11421, derivada do cruzamento entre esses parentais. A nível de campo, as diferentes observações com relação à intensidade de ataque foram evidentes. Não sendo possível uma comparação estatística entre os pais por estarem localizados em lotes diferentes, realizou-se a coleta de uma amostra de 100 folhas de cada uma das quatro faces de exposição das plantas e observou-se que o cultivar Icatu H4782-7-882 apresentou 61% de suas folhas com pelo menos uma lesão, enquanto em C1195-5-6-2 apenas 9% das suas folhas estavam lesionadas. Existe a possibilidade dessa diferença ser devida à presença de níveis distintos da população da praga nos respectivos lotes. Em laboratório no entanto, as mesmas relações foram observadas (Quadro 5).

As diferenças entre os dois parentais foram nítidas. C1195-5-6-2 apresentou média de 1.33 DLP, 1.83 pontos de NV e 4.04 cm² se ADP. Todas essas médias

diferiram estatisticamente das médias de H4782-7-882, ou seja, 4.83 DLP, 6.42 pontos de NV e 14.84 cm² de ADP. Não se notou diferença entre os pais quanto à preferência por oviposição. Em média foram depositados 31.83 ovos em C1195-5-6-2 e 37.92 em H4782-7-882.

Quadro 5. Resistência à *P. coffeella* apresentada pela geração parental avallada em testes de laboratório através dos parâmetros número de ovos (NO), discos lesionados por parcela (DLP), nota visual (NV), área danificada por parcela (ADP) e área danificada por lagarta (ADL).

| Parental* | NO | DLP | NV | ADP | ADL |
|-------------|--------|-------|--------|-----------------|-----------------|
| | nº | nº | pontos | cm ² | cm ² |
| C1195-5-6-2 | 31.83a | 1.33b | 1.83b | 4.04b | 0.06b |
| H4782-7-882 | 37.92a | 4.83a | 6.42a | 14.84a | 1.20a |

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Tukey 5%)

A resistência de C1195-5-6-2, relatada por Medina Filho (12) foi portanto confirmada pelos experimentos realizados em laboratório e também pela determinação de diferenças na ADL. Cada lagarta, danificou, em média, 0.06 cm² de área foliar em C1195-5-6-2 e 1.2 cm² em H4782-7-882.

É interessante notar que a ADL, 0.13 cm², em folhas de *C. racemosa* (9), é comparável à 0.06 cm² obtido para C1195-5-6-2. Como C1195-5-6-2 é resultante de dois retrocruzamentos para *C. arabica*, de um triplóide entre *C. arabica* e *C. racemosa*, é evidente que a resistência presente em *C. racemosa* foi transmitida aos descendentes, por três gerações. A resistência apresentada por *C. racemosa* (12), aliada à relativa facilidade de pegamento nos cruzamentos com *C. arabica* (4) tem sido uma das principais razões de seu emprego no programa de obtenção de cafeeiros com resistência ao bicho mineiro.

Com relação a geração F1, pode-se verificar que a oviposição foi uniforme entre os tratamentos, não sendo observadas diferenças significativas entre os mesmos. H11421-4 com 54.5 ovos, foi o tratamento mais procurado e H11421-16 com 26.5 ovos, aquele em que houve menor oviposição, sem contudo a diferença atingir níveis estatisticamente significativos (Quadro 6). A discriminação dos genótipos em função dos níveis de resistência apresentados tornou-se bastante simples com a análise dos demais parâmetros.

Quadro 6. Avaliação da resistência à *P. coffeella* de plantas parentais (H4782-7-882 e C1195-5-6-2) e híbridos F₁, segundo os parâmetros número de ovos (NO), discos lesionados por parcela (DLP), nota visual (NV), área danificada por parcela (ADP) e área danificada por lagarta (ADL) em testes de livre escolha realizados em laboratório.

| Genótipos* | NO | DLP | NV | ADP | ADL |
|-------------|--------------------|---------------------|---------------------|----------------------|---------------------|
| | n° | n° | pontos | cm ² | cm ² |
| H4782-7-882 | 37.75 _a | 5.50 _{a-c} | 7.25 _{a-c} | 14.17 _{a-c} | 1.13 _a |
| C1195-5-6-2 | 20.50 _a | 2.25 _{fg} | 2.75 _{c-i} | 5.89 _{d-g} | 0.03 _g |
| H4782-7-882 | 42.25 _a | 5.50 _{a-c} | 7.50 _{ab} | 17.20 _{ab} | 1.12 _a |
| C1195-5-6-2 | 36.75 _a | 2.75 _{d-g} | 3.50 _{c-i} | 7.72 _{c-g} | 0.05 _{c-g} |
| H4782-7-882 | 42.00 _a | 5.50 _{a-c} | 7.25 _{a-d} | 15.38 _{a-d} | 1.18 _a |
| C1195-5-6-2 | 35.50 _a | 3.00 _{c-g} | 2.75 _{d-i} | 8.41 _{b-g} | 0.05 _{fg} |
| H11421-1 | 37.00 _a | 3.75 _{a-g} | 2.75 _{c-i} | 10.57 _{c-g} | 0.67 _b |
| H11421-2 | 38.00 _a | 2.50 _{c-g} | 2.00 _{hi} | 6.21 _{d-g} | 0.15 _{c-f} |
| H11421-3 | 47.00 _a | 5.25 _{a-f} | 6.50 _{a-f} | 16.73 _{a-c} | 0.97 _{ab} |
| H11421-4 | 54.50 _a | 3.25 _{b-g} | 2.00 _{g-i} | 4.45 _{c-g} | 0.18 _{c-c} |
| H11421-5 | 43.00 _a | 5.75 _{ab} | 8.50 _a | 16.73 _{a-c} | 1.08 _{c-c} |
| H11421-6 | 43.75 _a | 5.50 _{a-c} | 7.75 _{a-c} | 14.95 _{a-c} | 1.12 _a |
| H11421-7 | 29.75 _a | 2.00 _{b-g} | 1.75 _{hi} | 2.06 _g | 0.13 _{d-g} |
| H11421-8 | 33.25 _a | 2.25 _{fg} | 2.75 _{d-i} | 6.08 _{d-g} | 0.19 _{cd} |
| H11421-9 | 54.00 _a | 6.00 _a | 9.00 _a | 17.93 _a | 1.15 _a |
| H11421-10 | 52.50 _a | 5.75 _{ab} | 8.25 _a | 16.72 _{a-c} | 1.07 _a |
| H11421-11 | 29.00 _a | 2.75 _{d-g} | 4.00 _{b-i} | 8.37 _{b-g} | 0.34 _c |
| H11421-13 | 38.25 _a | 2.00 _g | 1.50 _i | 4.01 _{fg} | 0.16 _{c-f} |
| H11421-15 | 53.75 _a | 6.00 _a | 7.75 _{a-c} | 17.12 _{a-c} | 1.11 _a |
| H11421-16 | 21.50 _a | 5.25 _{a-d} | 6.25 _{a-h} | 13.15 _{a-f} | 0.95 _{ab} |
| H11421-17 | 40.50 _a | 1.75 _g | 2.25 _{f-i} | 4.99 _{c-g} | 0.34 _c |
| H11421-18 | 42.25 _a | 5.75 _{ab} | 8.80 _{ab} | 16.82 _{a-c} | 1.12 _a |
| H11421-19 | 23.50 _a | 5.75 _{ab} | 6.75 _{a-g} | 14.23 _{a-c} | 1.01 _{ab} |
| H11421-20 | 43.25 _a | 6.00 _a | 8.00 _{ab} | 17.73 _a | 0.97 _{ab} |
| CV (%) | 11.4 | 11.3 | 12.4 | 13.4 | 13.6 |

* Médias seguidas por uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Tukey 5%).

Medina Filho *et al.* (13) investigando as infestações em diversos híbridos interespecíficos, sugeriram que a resistência encontrada nas espécies diplóides seria de natureza dominante; e que poderia ser condicionada por um par de alelos com modificadores. Ressaltaram ainda que algumas plantas poderiam ser heterozigotas, principalmente devido à característica alógama dessas espécies diplóides.

Como C1195-5-6-2 é oriundo de dois retrocruzamentos para *C. arabica* suscetível, seria esperado que fosse um indivíduo heterozigoto para resistência ao bicho mineiro, o que explicaria a segregação na progênie H11421.

Verifica-se, pelo Quadro 7, que são altamente significativas as correlações entre NV atribuída em campo nas épocas e anos de alta infestação com as avaliações em laboratório. Isso demonstra a aplicabilidade do método aqui desenvolvido na seleção de cafeeiros com resistência a *P. coffeella*. Tal seleção durante o programa de

melhoramento pode ser realizada em folhas de mudas novas, portanto em uma etapa anterior ao plantio dos ensaios de campo, nos quais seriam incluídas e avaliadas agronomicamente somente aquelas plantas com certo nível de resistência. Além da óbvia economia de tempo e recursos, o teste de laboratório permite a seleção em qualquer época do ano sob condições uniformes.

Quadro 7. Coeficientes de correlação (r) entre a nota visual atribuída no campo (NVC) e os parâmetros discos lesionados por parcela (DLP), nota visual (NV), área danificada por parcela (ADP) e área danificada por lagarta (ADL) determinados em laboratório na geração F₁.

| Parâmetros | r | '5%(16 GL) |
|------------|------|--------------|
| NVC/DLP | 0.91 | 8.78; P>0.01 |
| NVC/NV | 0.92 | 9.39; P>0.01 |
| NVC/ADP | 0.89 | 7.81; P>0.01 |
| NVC/ADL | 0.91 | 8.78; P>0.01 |

Possibilita, ainda, a repetição dos testes em plantas individuais de gerações segregantes. Considerando-se essas vantagens e a confiabilidade do método evidenciada pela alta correlação entre os testes de laboratório e as avaliações de campo feitas em diversos anos, sugere-se a utilização rotineira desse método no programa de melhoramento visando resistência ao bicho mineiro em execução na Seção de Genética do Instituto Agronômico de Campinas.

CONCLUSOES

Constatou-se que a população de adultos de 150 crisálidas por caixa de testes é a mais adequada, proporcionando infestações tanto mais uniformes, quanto maior o tamanho das parcelas. A distinção entre o grau de resistência de cafeeiros pode ser quantitativamente avaliada nos discos de folhas através da área danificada ou de modo mais prático, em trabalhos de rotina, simplesmente pela atribuição de uma nota visual ao dano causado pelas lagartas minando os discos de cada parcela.

Os discos de folhas para esses testes podem ou não incluir a nervura central pois sua presença não influe nos danos provocados pelas lagartas. Ao contrário das infestações em campo, onde o terceiro, quarto e quinto pares de folhas do ramo são mais atacados, nos testes de laboratório os discos oriundos do primeiro ao sexto par são igualmente atacados, mostrando que a idade e a coloração das folhas "per se" não são fatores que determinam a baixa infestação das folhas novas no campo.

Os parâmetros discos lesionados por parcela, nota visual, área foliar danificada por parcela e área foliar danificada por lagarta, confirmam a acentuada resistência genética do cafeeiro C1195-5-6-2, descendente de uma hibridação entre *C. racemosa* e *C. arabica*, utilizado como fonte de resistência ao bicho mineiro em programas de melhoramento.

A resistência genética ao bicho mineiro presente em C1195-5-6-2 e expressa na geração F_1 de cruzamentos entre essa planta e cultivares suscetíveis. A segregação para resistência nos seus descendentes parece ser devida à natureza heterozigota de C1195-5-6-2. Os exemplares resistentes apresentam, tipicamente reduzida área foliar danificada pelo inseto.

LITERATURA CITADA

1. ALMEIDA, P.R. 1973. O "bicho mineiro" *Perileuoptera coffeella* (Guérin-Meneville) como fator de restrição na produção do cafeeiro. In Reunião Anual da Sociedade Entomológica do Brasil (1., Viçosa) Resumos. p. 31.
2. BIGGER, M. 1969. Partial resistance of arabica coffee to the coffee leaf miner *Leucoptera meyricki* Ghesq. (Lepidoptera - Lyonetiidae). East African Agricultural and Forestry Journal (Nairobi) 34(4):441-445.
3. CARDENAS M., R. 1981. Caracterización histo-morfológica del daño del minador de la hoja, *Leucoptera coffeella* en especies e híbridos de *Coffea* spp. y observaciones sobre resistencia. Tesis M.Sc. Bogotá, Universidad Nacional de Colombia 69 p.
4. CARVALHO, A.; MONACO, L.C. 1968. Relaciones genéticas de especies seleccionadas de *Coffea*. Cafe (Perú) 9(4):1-19.
5. CROWE, T.J. 1964. Coffee leaf miners in Kenya. II. Causes of outbreaks. Kenya Coffee 29(342):223-231.
6. ESKES, A.B. 1983. The use of leaf disk inoculations in assessing resistance to coffee leaf rust (*H. vastatrix*). Netherlands Journal Plant Pathology 88:127-141.
7. GUERREIRO FILHO, O.; GONÇALVES, W.; MEDINA FILHO, H.P.; CARVALHO, A. 1985. Avaliação de progênies derivadas de retrocruzamentos de *C. arabica* com *C. racemosa* quanto ao ataque pelo bicho mineiro (*Perileuoptera coffeella*). In Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras (12., 1985, Caxambu) Resumos. Rio de Janeiro, IBC/GERCA. p. 195-196.
8. GUERREIRO FILHO, O.; MEDINA FILHO, H.P. 1987. Resistência genética à *Perileuoptera coffeella* em *Coffea salvatrix* e *Coffea brevipes*. Ciência e Cultura (Bra.) 39(7):749-750. Suplemento.
9. GUERREIRO FILHO, O.; MEDINA FILHO, H.P.; CARVALHO, A. 1991. Fontes de resistência ao bicho mineiro, *Perileuoptera coffeella*. Bragantia, Campinas, 50(1):45-55.
10. KATTIYAR, K.P.; FERRER, F. 1968. Rearing technique biology and sterilization of the coffee leaf miner, *Leucoptera coffeella*, Guer. (Lepidoptera-Lyonetiidae). Viena, International Atomic Energy Agency. p. 165-175.
11. LARA, F.M. 1979. Principios de resistência de plantas a insetos. Piracicaba, Livroceres. 207 p.
12. MEDINA FILHO, H.P.; CARVALHO, A.; MEDINA, D.M. 1977. Germoplasma de *Coffea racemosa* e seu potencial no melhoramento do cafeeiro. Bragantia 36:43-46. Nota II.
13. MEDINA FILHO, H.P.; CARVALHO, A.; MONACO, L.C. 1977. Melhoramento do cafeeiro: Observações sobre a resistência do cafeeiro ao bicho mineiro. Bragantia 36(11):131-137.
14. MEDINA FILHO, H.P.; CARVALHO, A.; GONÇALVES, W.; LEVY, F.A. 1983. Melhoramento do cafeeiro visando resistência ou tolerância ao bicho mineiro (*Perileuoptera coffeella*). In Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras (10., 1983, Poços de Caldas). Resumos. Rio de Janeiro, IBC/GERCA. p. 84-86.

15. NANTES, J.F.D.; PARRA, J.R.P. 1977. Avaliação de danos causados por *Perileuoptera coffeella* (Guérin-Meneville, 1842) (Lepidoptera - Lyonetiidae), em três variedades de café (*Coffea* spp). O Solo 69(2):26-29
16. NANTES, J.F.D.; PARRA, J.R.P. 1977. Queda de folhas em mudas de três variedades de café, provocada por *Perileuoptera coffeella* (Guérin-Meneville, 1842) (Lepidoptera - Lyonetiidae) Agros 12(2-3):55-58
17. NANTES, J.F.D.; PARRA, J.R.P. 1978. Influência da alimentação sobre a biologia de *Perileuoptera coffeella* (Guérin-Meneville, 1842) (Lepidoptera - Lyonetiidae) Científica 6(2):263-268
18. PARRA, J.R.P. 1975. Bioecologia de *Perileuoptera coffeella* (Guérin-Meneville, 1842) (Lepidoptera - Lyonetiidae) em condições de campo. Tese Doutorado. Piracicaba, ESALQ 114 p
19. PARRA, J.R.P. 1981. Biologia comparada de *Perileuoptera coffeella* (Guérin - Meneville, 1842) (Lepidoptera - Lyonetiidae) visando ao seu zoneamento ecológico no Estado de São Paulo. Tese (Livre Docência). Piracicaba, ESALQ 98 p.
20. SPEER, M. 1949. Observações relativas a biologia do "bicho mineiro das folhas do cafeeiro" *Perileuoptera coffeella* (Guérin-Meneville) (Lepidoptera - Lyonetiidae). Arquivos do Instituto Biológico 19:31-47.
21. STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H. 1980. Principles and procedures of statistics. Tokyo, McGraw-Hill. 633 p
22. TAUNAY, A.E. 1945. Pequena história do café no Brasil. Rio de Janeiro, Departamento Nacional do Café 558 p.

GARCIA G., J.E.; FUENTES G., G. 1992. Opciones al Uso Unilateral de Plaguicidas en Costa Rica: Pasado - Presente - Futuro. San José, C.R., EUNED. 149 p.

Quiénes trabajamos en el área del manejo de plagas, sabemos que antes del surgimiento de los plaguicidas sintéticos, los agricultores combatían las plagas o al menos coexistían con ellas mediante el uso de plaguicidas botánicos, algunos compuestos inorgánicos y varias prácticas agrícolas; algunas de las cuales de carácter natural se desvanecieron, opacadas por el éxito de los plaguicidas. Otras lograron convivir con el uso de esos productos y han permanecido más o menos inalteradas. Otras, o los principios que les dieron sustento, han sido pulidas con el apoyo del conocimiento científico y, en esa medida, utilizadas en forma más refinada.

Los autores, colegas y respetados amigos, con una paciencia y tenacidad envidiables, pero sobre todo con una gran visión de futuro, han dedicado mucho de su valioso tiempo en los últimos años a recopilar las prácticas de combate natural empleadas en Costa Rica. Una de sus metas es la sistematización en una base de datos de aquellas prácticas que subsisten aún en comunidades rurales. Otra, también en ese campo, es la sistematización del conocimiento formal generado en los centros de investigación. Su primer gran fruto, es este libro que hemos reseñado.

Hoy cuando el manejo integrado de plagas (MIP), como alternativa al empleo unilateral y desmedido de los plaguicidas, ha tomado un auge tan importante en el plano mundial, esta publicación viene a llenar un vacío sentido en Costa Rica y en la región centroamericana y caribeña. Las aproximadamente seiscientas citas recopiladas son un verdadero tesoro que, bien aprovechado, permitirá culminar caminos que han quedado a medio recorrer como aquellos estudios inconclusos o no validados en la práctica concreta, a la vez que abrir promisorias sendas que nos conduzcan a ampliar y profundizar nuestro conocimiento sobre el manejo de plagas, para materializarlo en la práctica.

No cabe duda que los potenciales usuarios de esta obra (estudiantes, profesores, investigadores y productores relacionados con las actividades agrícola, forestal, pecuaria y con la salud humana) encontrarán en esta obra ideas y hechos y no recetas, para redefinir lo que se ha hecho hasta hoy en el país en el área del combate de plagas. Y, cada vez que la utilicemos, estaremos agradeciendo tácitamente a los autores la generosidad con que nos entregaron su tiempo y esfuerzo, para ahorrándonoslo a nosotros.

DR. LUKO HILJE
AREA DE FITOPROTECCIÓN
CATIE

Respuesta de Tres Híbridos Comerciales de Maíz a la Inoculación con *Azospirillum*¹

I. García de Salamone*, M.A. Monzón de Asconegui**,
M. Zawosnik**, M. Zanchetti**

ABSTRACT

In order to analyse the influence of *Azospirillum* inoculation interacting with nitrogen fertilization on corn, a field trial using three bacterial strain and Dekalb 3F-22, Cargill R-157 and Continental RF-88 corn hybrids was carried out. Yield and its components, biomass and nitrogen content in the grain, were the parameters assessed. Among them, only the yield component 1000-kernel weight showed significant differences for the "hybrid x strain x fertilization" interaction. While Dekalb 3F-22 and Cargill R-157 reached the highest 1000-kernel weights with nitrogen supplied and when inoculated with strains 10M and 59, respectively, Continental RF-88 reached its highest weight with strain 7M and without fertilization. Field nitrogen fixation, which was estimated considering the acetylene reduction activity exhibited by samples taken at the flowering stage, was significantly higher for inoculated treatments, exceeding that of the control unit in 91% in case of unfertilized plots. The most remarkable effect of inoculation, however, was noticed in terms of root development by means of a pot experiment, which showed an increase of 100% and 150% in the root surface area of Dekalb 3F-22 plants inoculated with strains 7M and 10M, respectively.

Key words: Maize, *Azospirillum*, inoculation, nitrogen fertilization, nitrogen fixation.

COMPENDIO

Para determinar la influencia de la inoculación con *Azospirillum* en interacción con la fertilización nitrogenada sobre el cultivo de maíz, se realizó un ensayo de campo empleando tres cepas bacterianas y los híbridos Dekalb 3F-22, Cargill R-157 y Continental RF-88. Los parámetros evaluados fueron el rendimiento y sus componentes, la biomasa y el contenido de proteína en el grano. De ellos, el único que mostró diferencias significativas, para la interacción híbrido x cepa x fertilización, fue el componente del rendimiento peso de 1000 semillas; alcanzando el Dekalb 3F-22 y el Cargill R-157 los valores máximos con agregado de N e inoculados con cepas 10M y 59, respectivamente. Por el contrario, Continental RF-88 presentó el pico para peso de 1000 granos sin fertilización y en interacción con la cepa 7M. La fijación del N al campo, estimada con base en la actividad de reducción del acetileno y determinada en muestras tomadas en floración, fue significativamente mayor en los tratamientos inoculados, y superó a la del control en 91% en las parcelas sin fertilizar. Sin embargo, el efecto más destacado de la inoculación se obtuvo en el desarrollo radical en un ensayo en macetas; observándose para el híbrido Dekalb 3F-22 incrementos en su superficie radical del 100% con la cepa 7M y del 150% con la cepa 10M.

Palabras clave: Maíz, *Azospirillum*, inoculación, fertilización nitrogenada, fijación de nitrógeno.

INTRODUCCION

Diversos autores han expuesto los efectos benéficos en los rendimientos por asociación de bacterias del género *Azospirillum* con raíces de gramíneas forrajeras y de grano en condiciones de campo (1, 17, 20). En la mayoría de los casos, los incrementos hallados fueron alrededor del 20%, sin embargo en algunos trabajos se señalan aumentos de hasta un 60% (19).

Azospirillum es un activo fijador de N en condiciones de laboratorio microaeríferas. Por ello, en general, se atribuye como respuesta la inoculación a la fijación biológica de N atmosférico (FBN); no obstante existen opiniones dispares en este sentido. Según Von Bullow y Dobereiner (23) y Rennie (21), la fijación de N en el cultivo de maíz desempeña un papel importante, pero se manifiesta en forma diferente de acuerdo con el genotipo considerado. Asimismo, Dobereiner y Baldani (7), y Freitas *et al.* (9) observaron mayor rendimiento y acumulación de N en el grano al inocular maíz con cepas obtenidas de raíces esterilizadas de este cereal frente a otras aisladas de suelo rizosférico.

Por otra parte, en plantas de trigo, Kapulnik *et al.* (10) verificaron la existencia de un marcado efecto de la inoculación con *Azospirillum* sobre el largo, área y grado de ramificación radical, aspectos relacionados con la producción de sustancias hormonales, tales como

¹ Recibido para publicación el 15 de enero de 1991.
Los autores agradecen al Ing. Agr. E. Dellepiane por su colaboración en el manejo del cromatógrafo de gases.
Este trabajo fue subsidiado por la SECYT (res 275/86) y apoyado por la empresa Ryzobacter Argentina S.A.
* Cátedra de Cerealicultura; Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires; Av. San Martín 4453, (1417) Capital Federal, Arg.
** Cátedra de Microbiología; Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires; Av. San Martín 4453, (1417) Capital Federal, Arg.

auxinas, giberelinas y citoquininas (22). Esta estimulación en el desarrollo radical podría implicar un considerable incremento en el potencial de absorción de agua y nutrientes por parte de la planta.

Dobereiner (8) señala que *Azospirillum* reduce activamente el NO_3^- , facilitando, de esta manera, su asimilación desde el suelo. Se supone que esta activa reducción de nitratos en las raíces de plantas inoculadas puede atribuirse a la actividad de la enzima nitrato reductasa de la bacteria (3). Esto podría relacionarse con el aumento de la eficiencia de los fertilizantes nitrogenados en formas nítricas y amoniacales, que, en el caso de maíz, puede oscilar alrededor de un 40% (6). En este sentido Millet y Feldman (14), Pacovsky *et al.* (18) sugieren la posibilidad de combinar los efectos, aún no definidos, de la inoculación con *Azospirillum* y la práctica de la fertilización, pues han observado una mejor respuesta a la inoculación cuando se aplica un fertilizante nitrogenado en condiciones de campo.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la inoculación con *Azospirillum* spp. sobre varios atributos de tres híbridos comerciales de maíz de amplia difusión, en la zona maicera núcleo de Argentina. Para ello se realizaron dos experimentos, uno de campo y otro en macetas.

MATERIALES Y METODOS

Experimento de campo

En el campo experimental del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)-Pergamino, Provincia de Buenos Aires, Arg., se efectuó el experimento de campo. El lote considerado pertenece a la serie Pergamino, con alteraciones debidas al uso intensivo del suelo, durante 15 años de cultivo de maíz; el contenido de nitratos al momento de la siembra fue de 65 partes por millón.

El experimento tuvo un arreglo factorial $3 \times 4 \times 2$, donde las variables consideradas fueron tres híbridos de maíz, cuatro tratamientos de inoculación y dos niveles de fertilización nitrogenada. El diseño estadístico esco-

gido fue de bloques completos alatorios con cuatro repeticiones.

Los híbridos de maíz empleados fueron Dekalb 3F-22, Cargill R-157 y Continental RF-88. (Para facilitar la lectura del texto, se designan a los híbridos como: Dekall, Cargill y Continental).

Los cuatro tratamientos de inoculación corresponden a tres cepas de *Azospirillum* y un testigo sin inocular. Las cepas utilizadas fueron las nativas 7M y 10M, identificadas como *A. brasilense*, y la cepa 59 de *A. lipoferum* proporcionada por el Centro Nacional de Pesquisa em Biologia do Solo (CNPBS) de la Empresa Brasileña de Investigación Agropecuaria (EMBRAPA), Río de Janeiro, Bra. Las cepas 7M y 10M fueron aisladas de raíces esterilizadas de cultivos de maíz ubicados en la localidad bonaerense de Junin, según la metodología descrita por Okon *et al.* (16).

Los dos niveles de fertilización nitrogenada considerados fueron 0 kg y 100 kg, como urea al volco, 23 días después de la siembra (21 de octubre de 1987). Cada unidad experimental, de 21 m², constaba de cuatro hileras distanciadas a 0.70 m; la distancia entre plantas fue de 0.26 m, representando una densidad de 52 000 plantas por hectárea.

La inoculación se realizó con la siembra, colocando al costado de la semilla una dosis masiva de inoculante preparado con base en turba estéril impregnada con el correspondiente caldo bacteriano. Para obtener el caldo bacteriano, cada cepa se cultivó por espacio de 36 h en malato líquido (16), con 1 g l⁻¹ de cloruro de amonio (NH_4Cl), a 30°C bajo agitación continua.

El contenido de humedad del inoculante fue del 50% y la concentración bacteriana fue de 4×10^7 ufc por gramo de producto.

Entre las labores culturales aplicadas se incluye una escardillada y un aporque; el control de malezas se realizó en forma manual.

En el Cuadro 1 se presentan los datos de precipitaciones a lo largo del ciclo del cultivo.

Cuadro 1. Precipitaciones durante el ciclo del cultivo.

| | Set. | Oct | Nov. | Dic. | Enero | Feb | Marzo | Abril |
|--------------------|------|-------|-------|------|-------|------|-------|-------|
| Agua caída | 12.9 | 120.7 | 129.5 | 92.6 | 71.3 | 63.2 | 382.2 | 53.9 |
| Días precipitación | 2 | 10 | 9 | 12 | 8 | 10 | 18 | 7 |

El efecto de la inoculación fue estimado en función de la medida del rendimiento y de sus componentes, del contenido proteico del grano y de la producción de biomasa. Este último parámetro fue evaluado en floración y después de la madurez fisiológica.

Para calcular el rendimiento en grano se contaron las espigas de la parcela cosechable de 10 m²; y se estimó el número de hileras por espiga, el de granos por hilera y el peso de 1000 granos (P-1000), con base en cuatro plantas de cada parcela tomadas al azar. También se calculó el número de espigas por planta.

El porcentaje de proteína del grano se estimó de acuerdo con el contenido de N determinado por el método microkjeldahl (15).

La biomasa producida se estimó calculando el peso seco de cuatro plantas tomadas de una de las hileras centrales de cada parcela, secando el material vegetal en estufa a 70°C hasta obtener un peso constante.

Con el fin de evaluar la capacidad del método de reducción de acetileno para detectar diferencias en la FBN en condiciones de campo, se comparó la producción de etileno por planta y por hora de cuatro tratamientos incluidos en el experimento. Estos tratamientos fueron del híbrido Dekalb sin inocular e inoculado con la cepa 7M, con y sin aplicación de fertilizante nitrogenado. Para ello se emplearon cilindros metálicos de 14.5 cm de diámetro y 21 cm de altura. Los mismos fueron introducidos en el suelo, a través de la planta en floración; posteriormente se extrajeron con ayuda de una pala. Las muestras así obtenidas se humedecieron hasta capacidad de campo. Transcurridos tres días, se cortó y se descartó de las muestras la parte aérea; luego se incubaron en invernáculo durante 24 h con 10% de gas acetileno, calculado sobre un tercio del volumen del cilindro vacío. En cada extremo del cilindro, se le adosó en forma hermética una tapa metálica; de ellas, la superior tenía una válvula que permitía la inyección del gas. Después de la incubación, se determinó la producción de etileno en un cromatógrafo de gases Perkin Elmer 881.

Experimento en macetas

Se utilizaron macetas de polietileno color negro de 15 l de capacidad con vermiculita estéril como soporte. En cada una de ellas se

sembraron tres semillas del híbrido Dekalb, raleándose a una planta por maceta después de la emergencia. Los tratamientos considerados fueron las cepas nativas de *A. brasilense* 7M y 10M que se utilizaron en el experimento de campo, y un testigo constituido por una mezcla de ambas cepas esterilizada por autoclave.

Se empleó un diseño estadístico aleatorio con siete repeticiones por tratamiento, sometiéndose los resultados al análisis de variancia (ANVA).

Cada cepa fue multiplicada durante 24 h en las mismas condiciones que las empleadas en la obtención de los caldos bacterianos. La inoculación se hizo con 5 ml de suspensión bacteriana, que se depositaron en el cuello de la plántula en el momento del raleo. Periódicamente se regó con agua destilada y solución de Hoagland y Arno, con 50% del N indicado para la solución completa en el primer riego y con 5% en los posteriores, para evitar grandes déficit que hicieran peligrar el éxito del experimento (11).

Las plantas crecieron al aire libre durante 45 días. Las mismas fueron cosechadas cuando tenían ocho hojas emergidas. Las raíces se lavaron con agua corriente para eliminar todo resto de vermiculita que pudiera alterar la estimación de la superficie radical, siguiendo el método gravimétrico de Carley y Watson (5).

RESULTADOS

El Cuadro 2 muestra los rendimientos medios obtenidos para cada uno de los tratamientos del ensayo de campo. Puede observarse que las diferencias significativas registradas ($\leq 5\%$) son atribuibles únicamente al genotipo vegetal; y también que, contrariamente a lo esperado, la aplicación de 100 kg N ha⁻¹ a la siembra no incrementó en forma estadísticamente significativa el rendimiento en grano.

Cuadro 2. Rendimientos medios en grano (kg ha⁻¹).

| | | Tratamientos inoculados | | | |
|----------------------------------|-------------|-------------------------|-------|-------|---------|
| | | 7M | 10M | 59 | testigo |
| No fertilizados (0 kg • N/ha) | Dekalb | 6 332 | 5 997 | 6 075 | 5 865 |
| | Cargill | 6 712 | 6 547 | 6 765 | 6 402 |
| | Continental | 7 065 | 7 025 | 6 985 | 7 062 |
| Fertilizados (100 kg • N/ha) | Dekalb | 6 132 | 6 100 | 5 990 | 5 935 |
| | Cargill | 6 765 | 6 680 | 6 725 | 6 335 |
| | Continental | 6 745 | 7 117 | 6 175 | 6 702 |

Diferencia mínima significativa (DMS) = 604
Coeficiente de variación (CV) = 7.7%

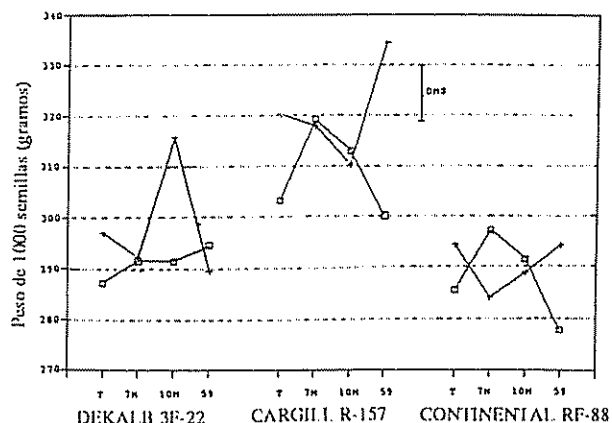


Fig. 1. Interacción cepa-fertilización para el peso de 1000 semillas de tres híbridos comerciales de maíz.

En la Fig. 1 se observa el peso de 1000 semillas, único componente del rendimiento que mostró diferencias significativas entre tratamientos, no sólo a causa del híbrido sino también como respuesta a la inoculación y a su interacción con el factor "fertilización nitrogenada".

Para los tratamientos sin fertilización sólo la cepa 7M produjo respuestas destacadas respecto del testigo para el P-1000, en el caso de Cargill y de Continental.

En relación con las de parcelas fertilizadas con N, la inoculación incidió de modo diferente. El híbrido Dekalb, que sin fertilización no respondió, produjo un P-1000 significativamente mayor que el control correspondiente al ser inoculado con la cepa 10M, en tanto que el Cargill lo hizo con la cepa 59. Se hace notar la marcada interacción negativa que tuvo lugar en el híbrido Continental al ser fertilizado e inoculado con la cepa 7M, lo que se tradujo en un P-1000 notoriamente inferior al obtenido con la misma cepa, pero sin fertilización.

Independientemente de las interacciones específicas, se debe destacar la superioridad del híbrido Cargill sobre los otros dos en relación al atributo que se analiza (Fig. 1). También se puede visualizar que el peso de 1000 semillas respondió positivamente al agregado de N en los tres híbridos empleados, de ellos el Cargill fue el que demostró tener mayor potencial de repuesta.

El Cuadro 3 muestra la biomasa producida en floración. El hecho más notorio es la pronunciada interacción negativa en los tres híbridos al inocular con la cepa 7M en parcelas fertilizadas con N. Por otra parte permite apreciar que la biomasa, a diferencia del rendimiento en grano, sí respondió positivamente al agregado de N. Es notorio que, contrariamente a lo encontrado para otras variables, la biomasa en floración tuvo poca influencia del genotipo vegetal. La biomasa durante la madurez fisiológica no mostró diferencias significativas entre los diferentes tratamientos.

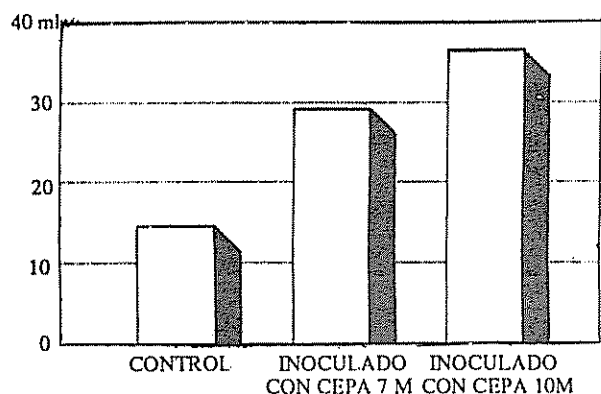
En el Cuadro 4 se presentan, para los cuatro tratamientos escogidos, los nanomoles de etileno producidos por planta y por hora de muestras de Dekalb extraídas en floración por medio de cilindros metálicos. Se puede apreciar que el método de reducción de acetileno a etileno aplicado sobre esas muestras permitió encontrar diferencias significativas en la FBN entre tratamientos inoculados (en este caso con la cepa 7M) y sus respectivos controles sin inocular.

Por último, en la Fig. 2 se muestran los valores medios de álcali consumido, en la estimación del área radical correspondiente al material vegetal cosechado en el ensayo en macetas. Es fácil visualizar que la inoculación del híbrido Dekalb con organismos vivos de las cepas nativas 7M y 10M de *A. brasilense* tuvo un destacado efecto favorable sobre el desarrollo del radical, con incrementos sobre el testigo del 100% y 150%,

Cuadro 3. Materia seca en floración (kg ha⁻¹)

| | | Tratamientos inoculados | | | Testigo |
|-----------------|-------------|-------------------------|---------|----------|----------|
| | | 7M | 10M | 59 | |
| No | Dekalb | 5 481 a | 5 383 a | 5 269 ab | 5 173 ab |
| Fertilizados | Cargill | 5 538 a | 5 508 a | 5 247 ab | 5 233 ab |
| (0 kg • N/ha) | Continental | 5 613 a | 5 430 a | 5 274 ab | 5 203 ab |
| | Dekalb | 4 798 b | 5 676 a | 5 269 ab | 5 676 a |
| Fertilizados | Cargill | 4 839 b | 5 669 a | 5 296 ab | 5 567 a |
| (100 kg • N/ha) | Continental | 4 823 b | 5 698 a | 5 309 ab | 5 598 a |

Las medias con igual letra no difieren estadísticamente del 5% según la prueba de rango múltiple de Duncan (12). Diferencia mínima significativa (DMS)= 522. Coeficiente de variación (CV)= 8.6%



Diferencia mínima significativa (DMS) = 7.5 Coeficiente de variación (CV) = 6.6%

Fig. 2 Consumo de NaOH (ml) en la estimación del área radical del híbrido Dekalb por el método de Carlet y Watson.

respectivamente. La diferencia registrada entre los dos tratamientos inoculados con bacterias vivas alcanzó una magnitud estadística importante, demostrando, de ese modo, que el genotipo bacteriano está implicado en este mecanismo de respuesta a la inoculación.

Cuadro 4. Producción de etileno a partir de acetileno para el híbrido Dekalb (nanosoles, planta⁻¹, hora⁻¹).

| | Testigo | Inoculado (cepa 7M) |
|-------------------------------|---------|---------------------|
| No fertilizados (0 kg • N/ha) | 89.6 c | 168.9 a |
| Fertilizados (100 kg • N/ha) | 92.5 c | 171.8 a |
| Fertilizados (0 kg • N/ha) | 89.2 c | 178.9 a |

| | Testigo | Inoculado (cepa 7M) |
|-------------------------------|---------|---------------------|
| No fertilizados (0 kg • N/ha) | 89.6 c | 106.8 b |
| Fertilizados (100 kg • N/ha) | 83.7 c | 109.9 b |
| Fertilizados (0 kg • N/ha) | 82.7 c | 108.9 b |

Cada valor es promedio de cuatro datos correspondientes a cuatro cilindros de muestra por parcela. Las medias con igual letra no difieren estadísticamente al 5% según la prueba de rango múltiple de Duncan. Diferencia mínima significativa (DMS)= 12.3. Coeficiente de variación (CV)= 2.7%.

DISCUSION

Si bien los resultados expuestos corresponden a un sólo año de experimento, es importante destacar que la interacción cepa-fertilización modificó, de manera estadísticamente significativa, un componente del rendimiento tan estable como el peso de 1000 semillas. No obstante, es preciso señalar que el tipo y magnitud de la respuesta estuvieron marcadamente influenciados por el genotipo vegetal.

La aplicación de 100 kg N ha⁻¹ en la siembra no incrementó en forma significativa el rendimiento en grano. Esto no era lo esperado considerando los años agrícolas previos, el tipo de cultivo antecesor y el nivel del aporte nitrogenado, el cual representa un valor promedio para la zona en estudio. En tal sentido Miguens *et al.* (13) observaron una respuesta positiva a la fertilización nitrogenada con niveles semejantes de nitratos a la siembra. Asimismo, Barrios *et al.* (2) obtuvieron un incremento en el rendimiento del grano de maíz, que varió entre un 28% y un 30% según el híbrido y la cepa bacteriana empleados, trabajando en condiciones experimentales similares.

Es posible suponer que los aumentos en el peso de 1000 semillas de los híbridos Cargill y Continental al ser inoculados con la cepa 7M y con la 10M, sin aplicación de fertilizante (Fig. 1), estén asociados a los aumentos de biomasa registrados para los tratamientos inoculados con estas cepas (Cuadro 3) y que obedezcan a una mejora en el N disponible para la planta vía FBN. La tasa de reducción de acetileno medida para tratamientos inoculados con la cepa 7M (Cuadro 4) demuestra que la FBN en el campo podría ser considerable, sobre todo en ausencia de fertilización nitrogenada. Nótese que la respuesta a la inoculación no fue significativa en rendimiento, pero en el nivel de la nitrogenasa la sensibilidad de respuesta fue considerable.

Sin embargo, el haber alcanzado notorios incrementos en el peso de 1000 granos en parcelas inoculadas y fertilizadas con N (Fig. 1), en las que la biomasa no aumentó sino que sufrió mermas (Cuadro 3), evidencia que la presencia de este microorganismo puede desencadenar otros mecanismos de respuesta, además de los ya señalados. Los resultados del experimento en macetas demuestran que el aumento de la superficie radical es uno de los efectos asociados a la interacción *Azospirillum*-maíz (10) que, al igual que en otras especies vegetales, fue particularmente evidente en la combinación Dekalb-cepa 10M (Fig. 2). Es importante destacar que las cepas 10M y 59 produjeron incrementos significativos en el peso de los 100 granos de los híbridos Dekalb y Cargill, pero sólo en parcelas fertilizadas (Fig. 1), lo que permite plantear como hipótesis que en estas cepas la respuesta involucraría un mejor aprovechamiento del N presente en el suelo. Este tipo de interacción ha sido documentada por diversos autores (3, 14).

Los datos obtenidos en este trabajo permiten inferir que al asociarse *Azospirillum* a las raíces de plantas de

maíz, varios mecanismos de respuesta podrían desencadenarse. De un modo muy general puede afirmarse que la fijación de N atmosférico llevada a cabo por la bacteria tiene lugar en un sistema radical mejor desarrollado, probablemente como consecuencia de un mayor abastecimiento de hormonas promotoras del crecimiento, y capaz de asimilar el N presente en el suelo de un modo más eficiente. Aún así, no siempre se encuentra respuesta a la inoculación en el rendimiento en grano, el cual es el resultado de numerosos y complejos mecanismos fisiológicos condicionados por aspectos ambientales y genéticos. El análisis de aspectos tales como intensidad de colonización y distribución relativa de microorganismos, mediante futuros experimentos que incluyan el estudio detallado de los mecanismos de respuesta, suministraría, quizás, elementos necesarios para intentar explicar la especificidad genótipo vegetal-genótipo bacteriano encontrada en el presente trabajo.

LITERATURA CITADA

1. ALBRECHT, S.L.; OKON, Y.; LONQUIST, J.; BURRIS, R.H. 1981. Nitrogen fixation by com-*Azospirillum* associations in a temperate climate. *Crop Science* 21:301-306.
2. BARRIOS, S.Z.; POTENZA, A.; LOPEZ, M.V. 1988. Respuesta diferencial en zeacultivo de biofertilizantes diazotrofos rizosféricos. Congreso Nacional de Maíz (4., Pergamino, Arg.). *Actas* 2:24-30.
3. BOODEY, R.M.; BALDANI, V.; BALDANI, J.I.; DOBEREINER, J. 1986. Effect of inoculation with *Azospirillum* spp. on nitrogen accumulation by field grown wheat. *Plant and Soil* 95:109-121.
4. BODDEY, R.M. 1987. Method for quantification of nitrogen fixation associated with gramineae. *Critical Reviews in Plant Sciences* 6(3):209-266.
5. CARLEY, H.E.; WATSON, R.D. 1966. A new gravimetric method for estimating root surface areas. *Soil Science* 102:289-291.
6. DELWICHE, C. 1977. Nitrogen fertilization in com. *Applied Environmental Microbiology* 24:967-980.
7. DOBEREINER, J.; BALDANI, J.I. 1982. Bases científicas para una agricultura biológica. *Ciencia e Cultura* 34:869-881.
8. DOBEREINER, J. 1985. Frontier research on nitrogen fixation in cereals and other Gramineae. In Conference organized by Third World Academy of Sciences. Proceedings. Hamenade, Hassan, Phna (Eds.). Trieste, Italia.
9. FREITAS, J. L. M.; DA ROCHA, R.; PEREIRA, P. A. A.; DOBEREINER, J. 1982. Materia orgánica e inoculação com *Azospirillum* spp. incorporação de N pelo milho. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 17:1423-1432.
10. KAPULNIK, Y.; GAFNY, R.; OKON, Y. 1985. Effect of *Azospirillum* spp. inoculation on root development and NO₃ uptake in wheat (*Triticum aestivum* cv. Miriam) in hydroponic systems. *Canadian Journal of Botany* 63:627-634.
11. LEDGARD, S.; SIMPSON, J.R.; FRENEY, J.; BERGENSEN, F. 1985. Field evaluation of ¹⁵N techniques for estimating nitrogen fixation. *Soil Biology and Biochemistry* 17:317-322.
12. LITTLE, I.; HILLS, F. 1983. Métodos estadísticos para la investigación en agricultura. Méx., Trillas. 270 p.
13. MIGUENS, M.; ROJAS, A.; CASAS, G. 1987. Producción de maíz. Convenio AACREA-Cargill. Cuaderno de Actualización Técnica no 42. 127 p.
14. MILLET, E.; FELDMAN, M. 1984. Yield response of a common spring wheat cultivar to inoculation with *Azospirillum brasilense* at various levels of nitrogen fertilization. *Plant and Soil* 80:255-260.
15. MITCHELL, H.T. 1972. Microdetermination of nitrogen in plant tissues. *Journal Association of Agricultural Chemistry* 55:1-3.
16. OKON, Y.; ALBRECHT, S.L.; BURRIS, R.H. 1977. Methods for growing *Spirillum lipoferum* and for counting it in pure culture and in association with plants. *Applied Environmental Microbiology* 33:85-88.
17. OKON, Y. 1982. *Azospirillum*: Physiological properties, mode of association with roots and its applications for the benefit of cereal and forage grass crops. *Israel Journal Botany* 31:214-220.
18. PACOVSKY, R.S.; PAUL, E.A.; BETHERLINFALVAY, B.J. 1985. Nutrition of sorghum plant fertilized with nitrogen or inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Plant and Soil* 85:145-148.
19. PATRIQUIN, D.G.; DOBEREINER, J.; JAIN, D.K. 1983. Sites and responses of association between diazotrophs and grasses. *Canadian Journal of Microbiology* 29(8):900-915.
20. RAI, S.A.; CAUR, A.G. 1982. Nitrogen fixation by *Azospirillum* spp. and effect of *Azospirillum lipoferum* on yield and N-uptake of wheat crop. *Plant and Soil* 69:233-328.
21. RENNIE, R.J. 1980. ¹⁵N-isotope dilution as a measure of dinitrogen fixation by *Azospirillum brasilense* associated with maize. *Canadian Journal Botany* 58:21-24.
22. TIEN, T.M.; GASKINS, M.H.; HUBELL, D.H. 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Applied Environmental Microbiology* 37:1016-1024.
23. VON BULLOW, F.W.; DOBEREINER, J. 1975. Potential for nitrogen fixation in maize genotypes in Brazil. *Proceedings of the National Academy of Science* 72:2389-2393.

Variabilidad Espacial de un Suelo Bajo Vegetación de *Prosopis* sp.¹

O. A. Bachmeier*, E. Buffa*

ABSTRACT

The regionalized variable theory, formerly known as geostatistics, allows to measurement of the spatial dependence of different soil properties, so as to establish soil sampling patterns and variability maps. In order to measure the influence of a *Prosopis* sp. canopy on soil spatial variability, a Typic Ustifluent soil, sited in Chancaní (31°20'LS, 65°28'W), Córdoba, Arg., was studied. A 15 m long and 1.5 m deep trench was dug under a *Prosopis* tree adjacent to an open area (begining 0.8 m from the trunk). Soil samples were taken from the first three horizons and 0.30 m horizontally apart, using a calibrated cylinder to take soil cores for bulk density (BD) analysis. On these sites, disturbed samples for pH and organic matter (OM) analysis were taken also. Autocorrelation and semivariance were calculated and plotted, using the data series obtained. It was concluded that, in the studied soil and in the under/outside canopy sampling sites, the soil properties showed a highly random pattern, with very low spatial dependence: up to 2 m for OM and up to 0.60 m for pH. BD did not show any significant spatial relations. Thus, random sampling is recommended, taking the minimum estimated number of samples, using classical statistical methods.

Palabras clave: Geoestadística, muestreo de suelos, *Prosopis*, teoría de las variables regionalizadas.

INTRODUCCION

Para los estudios detallados de suelo, con fines de investigación o de producción, es necesario el conocimiento de la variación en el espacio de las diversas propiedades del suelo. Los métodos estadísticos clásicos no permiten evaluar cómo varían esas propiedades de acuerdo con su posición espacial (4). Esa evaluación se logra mediante el uso de la geoestadística, basada en la teoría de las variables re-

COMPENDIO

La teoría de las variables regionalizadas, conocida como geoestadística, permite medir la dependencia espacial de las diferentes propiedades edáficas, pudiendo establecerse patrones de muestreo y elaborar mapas de variabilidad de suelo. A fin de medir la influencia de la canopla de *Prosopis* sp. (algarrobo) sobre la variabilidad edáfica, se estudió un suelo Ustifluent típico, ubicado en Chancaní (31°20' LS, 65°28'O), Córdoba, Arg. Se cavó una calicata bajo la copa de un ejemplar de algarrobo de 15 m de profundidad, desde 0.80 m del tronco hasta un área abierta adyacente. Las muestras de suelo se tomaron de los tres primeros horizontes, a una distancia horizontal de 0.30 m entre ellas y con un cilindro calibrado para evaluar la densidad aparente (DA). De los mismos lugares se extrajeron muestras disturbadas destinadas al análisis de pH y materia orgánica (MO). Con las series de datos obtenidas, se calcularon y graficaron la autocorrelación y la semivariancia. Se concluyó que en el suelo estudiado, y en las posiciones de muestreo en la parte inferior y externa del árbol, las propiedades analizadas mostraron un comportamiento altamente aleatorio, con dependencia espacial sumamente baja: hasta 2 m para MO y menor que 0.60 m para pH. La DA no mostró relación espacial. En consecuencia se concluyó que es conveniente tomar muestras al azar, con un número estimado de muestras, determinado según la estadística clásica.

gionalizadas, según la cual una variable es "regionalizada" cuando posee dependencia espacial, es decir, cuando tiene algún grado de autocorrelación (7, 8).

El uso de la geoestadística en el análisis de la estructura de la variabilidad de un suelo, puede ayudar a la comprensión e identificación de los efectos espaciales inducidos por los factores formadores del suelo, durante los procesos de edafogénesis (7).

Además de la medida de autocorrelación, el semivariograma es esencial cuando se desea aplicar la técnica de Kriging, que permite estimar la distribución en el espacio de una determinada variable, y realizar extrapolaciones con validez estadística (5).

La estimación de la dependencia espacial requiere un gran número de muestras; por ello es necesario medir propiedades de fácil análisis que puedan inferir

1 Recibido para publicación el 8 de agosto de 1991
Este trabajo fue realizado con el apoyo económico del Board of Science and Technology for International Development (BOSTID), National Academy of Sciences, en el marco del Proyecto Management of Arboreal *Prosopis* in Agroforestry Production Systems (CRG Grant No. FGT-AR-2-87-65).

* Departamento de Recursos Naturales, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad Nacional de Córdoba, Casilla de Correos 509-5000, Córdoba, Arg.

sobre otras variables asociadas (2). Los mismos autores concluyen que la presencia de una significativa variancia con estructura espacial, y los cambios sistemáticos en el valor de ciertas variables edáficas, indican que se debe evitar el muestreo al azar.

Diversos autores sugieren rangos de relación espacial sumamente dispares para algunas propiedades edáficas: así, Trangmar *et al.* (6) citan valores que van desde 4 m hasta 320 m para calcular el pH y de 6 m para la densidad aparente. Kachanoski *et al.* (2) no encontraron autocorrelación para densidad aparente del horizonte a_1 , aunque sí para el espesor y masa del mismo. En un Molisol desarrollado sobre sedimento glacial, se halló una relación espacial del orden de 7 m para la materia orgánica (3).

El objetivo del trabajo fue evaluar en un suelo con vegetación natural de algarrobo (*Prosopis* sp.) la dependencia espacial de una propiedad químico-biológica, físico-química y física: materia orgánica, pH en CaCl_2 y densidad aparente, respectivamente.

MATERIALES Y METODOS

Suelo

Ustifluent típico, serie Los Pocitos II, ubicado en Chancani ($32^{\circ}20' \text{LS}$, $65^{\circ}28' \text{W}$), Departamento Pocho, Córdoba, Arg. (1).

Muestreo

Sobre las caras laterales de una calicata de 12 m de longitud, ubicada radialmente al tronco de un ejemplar de *Prosopis* sp. (DAP=27 cm), se extrajeron muestras de suelo con una distancia horizontal de 0.30 m una de otra (Lag = 0.30 m) de los tres primeros horizontes (A1, AC y Clca).

Análisis químicos y físicos

- Materia orgánica: método de Walkley y Black.
- pH: en solución de CaCl_2 0.01 M (relación suelo/solución 1:2.5).
- Densidad aparente: extracción de muestras sin disturbar, con cilindro de Kopecki.

Análisis estadístico

Las series de datos para cada horizonte y variable fueron transformados al eliminar las tendencias existentes, y utilizando el comando Trend del módulo series de SYSTAT.

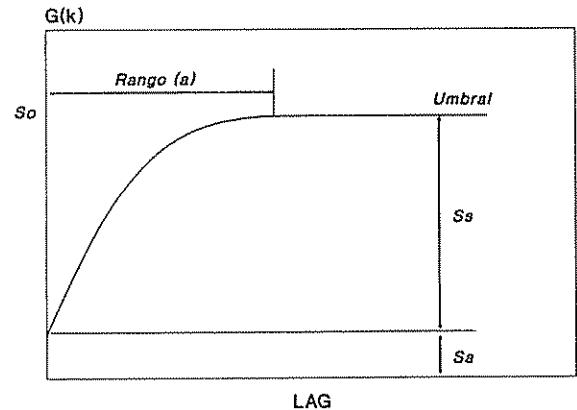
Sobre cada grupo de datos, separado por profundidad, se calculó el coeficiente de autocorrelación (R_k), según la expresión:

$$R_k = S_0^{-1} \cdot (1/N-k) \cdot \sum_{i=1}^{N-k} [X(i) - X_m] \cdot [X(i+k) - X_m]$$

Donde: S_0 = Variancia de población.
 $X(i)$ = i ésimo dato.
 X_m = Media estimada.
 N = Número de datos.
 K = Lag (desfasaje).

La semivariancia (G_k) fue calculada a partir de:

$$G_k = (N/2) \cdot \sum_{i=1}^N [X_i - X_{i+k}]^2$$



- LAG = Desfasaje o espaciamento entre muestras.
 $G(k)$ = Semivariancia en LAG = k .
 S_0 = Variancia total de la población.
 S_s = Variancia estructural: parte de S_0 explicada por la estructura de la serie de datos.
 S_a = Variancia aleatoria o efecto "Nugget": variancia debida a efectos de rango menor a la escala de medición.
Umbral = Valor en que S_s se hace igual a S_0 .
Rango = Espacio dentro del cual existe dependencia espacial.

Fig. 1 Semivariograma teórico de modelo esférico y sus parámetros relevantes (6).

Usando los coeficientes de autocorrelación y las semivariancias, se trazaron los correspondientes autocorrelogramas y semivariogramas, con el fin de evaluar gráficamente la estructura de la dependencia espacial. En la Fig. 1 se presenta un modelo de semivariograma esférico teórico.

RESULTADOS Y DISCUSION

En el Cuadro 1 se presentan los valores medios y los estadísticos de dispersión de materia (MO), pH en CaCl_2 (pH) y densidad aparente (DA), medidos en los tres horizontes de suelo estudiados: A1, AC y Clca. Se observa que los datos de MO poseen la mayor variabilidad, sobre todo en la superficie. Las medidas de pH y DA revelan una mayor homogeneidad en la población, especialmente en los horizontes AC y Clca. Sin embargo es notable que el coeficiente de variación de DA muestra cierta independencia de la profundidad, posiblemente al carácter aluvial del perfil.

Cuadro 1. Posición y dispersión de materia orgánica, pH en CaCl_2 y densidad aparente en los horizontes A1, AC y Clca. Muestras extraídas cada 30 cm, sobre una transecta radial a la copa de un ejemplar de *Prosopis* sp.

| materia orgánica (%) | | | |
|--------------------------|-------|-------|-------|
| | AL | AC | Clca |
| N | 33 | 33 | 33 |
| Mínimo | 1.10 | 1.10 | 1.10 |
| Máximo | 2.50 | 2.40 | 2.20 |
| Media | 1.68 | 1.59 | 1.64 |
| Desviación estándar | 0.35 | 0.25 | 0.22 |
| Coefficiente de var. (%) | 20.83 | 16.35 | 13.94 |

| pH en CaCl_2 | | | |
|--------------------------|------|------|------|
| | AL | AC | Clca |
| N | 33 | 33 | 33 |
| Mínimo | 6.13 | 7.20 | 7.77 |
| Máximo | 7.93 | 8.24 | 8.17 |
| Media | 7.26 | 8.06 | 7.93 |
| Desviación estándar | 0.47 | 0.19 | 0.10 |
| Coefficiente de var. (%) | 6.47 | 2.43 | 1.22 |

| Densidad aparente ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$) | | | |
|---|------|------|------|
| | AL | AC | Clca |
| N | 32 | 32 | 32 |
| Mínimo | 1.18 | 1.12 | 1.06 |
| Máximo | 1.40 | 1.39 | 1.25 |
| Media | 1.27 | 1.19 | 1.18 |
| Desviación estándar | 0.05 | 0.05 | 0.03 |
| Coefficiente de var. (%) | 3.62 | 4.02 | 2.89 |

La interpretación geoestadística de los datos medidos, para las tres variables analizadas, se detalla a continuación:

Materia orgánica

En la Fig. 2a se presenta la distribución de los datos de porcentaje de MO, según una transecta radial al árbol de *Prosopis* sp. Se nota la existencia de una tendencia

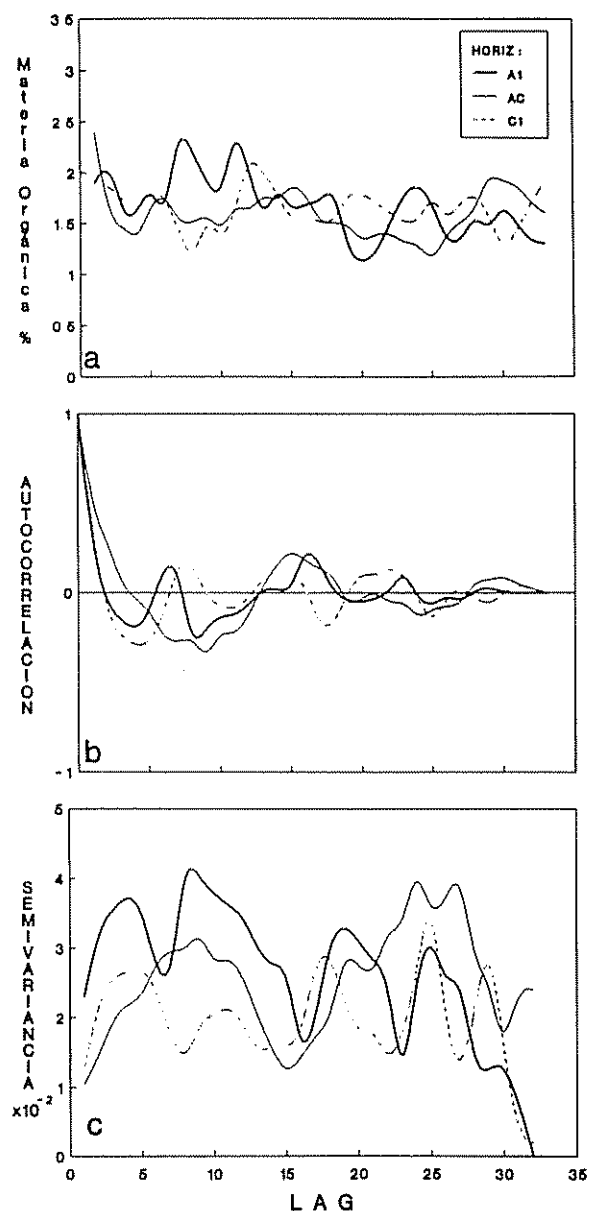


Fig. 2. a) Serie de datos de material orgánica; b) autocorrelograma y c) semivariograma, obtenidos a partir de 33 muestras de suelo separadas 0.30 m entre sí (LAG), para los horizontes A1, AC y Clca (transecta radial a la copa de un ejemplar de *Prosopis* sp.).

general decreciente, hacia el exterior de la canopia en los tres horizontes considerados. La variabilidad de las series de datos es elevada, aunque se atenúa en AC y Clca desde el límite de la canopia.

Una vez eliminada la tendencia existente en los datos, fue trazado el autocorrelograma (Fig. 2b) que señala una dependencia espacial muy baja (menor a 1 Lag) para los horizontes A1 y Clca. En AC, el valor de Lag es tres. Esto muestra un grado de dependencia espacial mucho menor que el observado por Kachanoski *et al* (2), aunque deben tenerse en cuenta las diferencias en el material originario de ambos suelos.

En los tres horizontes, el autocorrelograma muestra cierto grado de comportamiento oscilante, con una amplitud equivalente a cinco Lag en A1 y Clca, y a siete Lag en AC.

En el semivariograma (Fig. 2c) se observa que tanto en el A1 como en el Clca, la semivariancia (Gk) alcanza la variancia poblacional (So) en un rango de cuatro Lag. En AC dicho valor alcanza nueve en un Lag. Este comportamiento repite el mismo patrón del autocorrelograma, pero con valores que indican una mayor dependencia espacial.

Además es posible notar que el valor de variancia Nugget o aleatoria, se duplica en el A1, indicando que en él existen efectos de variación en una escala menor que la usada para la medición. También se detectan efectos periódicos provocados, sin duda, por otros factores que introducen "ruidos" en la medición de materia orgánica.

pH en CaCl₂ 0.01 M

Las mediciones de pH mostraron patrones de comportamiento claramente diferenciados en cada horizonte (Fig. 3a). En A1 se notó una gran variabilidad bajo la copa del árbol y, fuera de ella, los valores se estabilizaron con una tendencia general creciente. Una vez eliminada la misma, y graficado el autocorrelograma (Fig. 3b), se observó que no existía ninguna estructura en la variación medida. En el semivariograma (Fig. 3c), donde la variancia aleatoria se confundía con So y marcaba la ausencia de variancia estructural, se destacó lo aleatorio de la distribución de los valores de pH. El semivariograma mostró un comportamiento oscilante, con un patrón que sugería la presencia de tres factores actuando con distinto rango de variación.

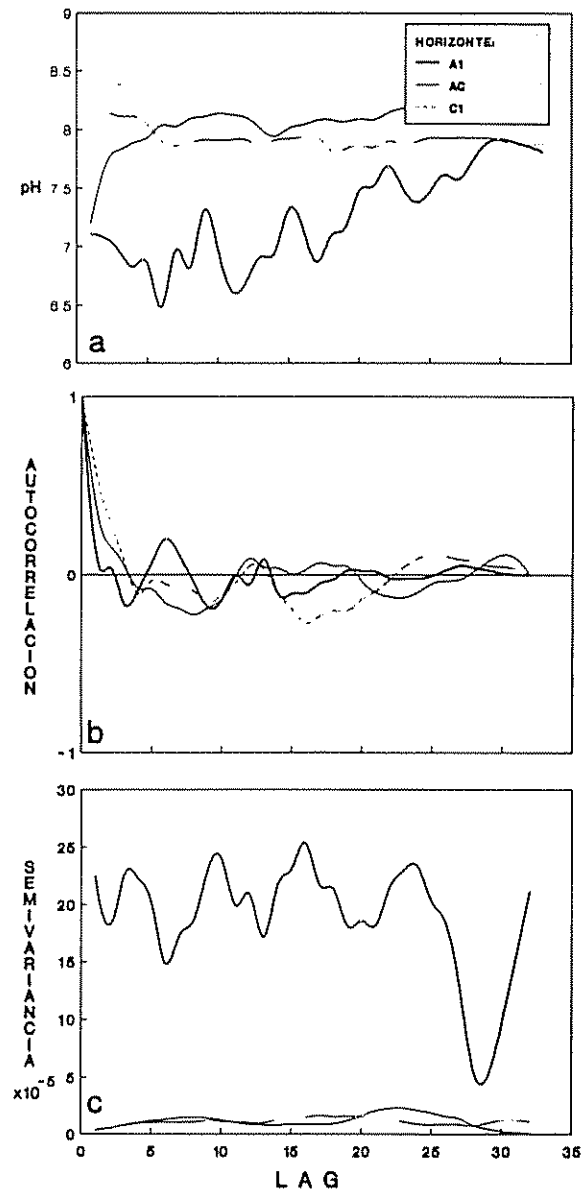


Fig. 3. a) Serie de datos de pH en CaCl₂; b) autocorrelograma y c) semivariograma, obtenidos a partir de 33 muestras de suelo separadas 0.30 m entre sí (Lag), para los horizontes A1, AC y Clca (transecta radial a la copa de un ejemplar de *Prosopis* sp.)

El pH del horizonte AC parte de una estimación ligeramente superior a 7, pero se estabiliza alrededor de pH 8 (Fig. 3a), en un Lag siete. En Clca, en cambio, el valor de la variable a lo largo de toda la serie es constante. El autocorrelograma de ambos horizontes muestra una ligera dependencia espacial, pero no se extiende más allá de un Lag dos (Fig. 3b).

En la Fig. 3c se percibe que el semivariograma es prácticamente plano sin variancia asociada a la estructura de los datos. No aparece, en este caso, el patrón cíclico observado en el A1.

Densidad aparente

Las medidas de densidad aparente (Fig. 4a) indican una importante dispersión de los datos bajo la canopia y disminuyen en el área externa de ella. Dicha variabi-

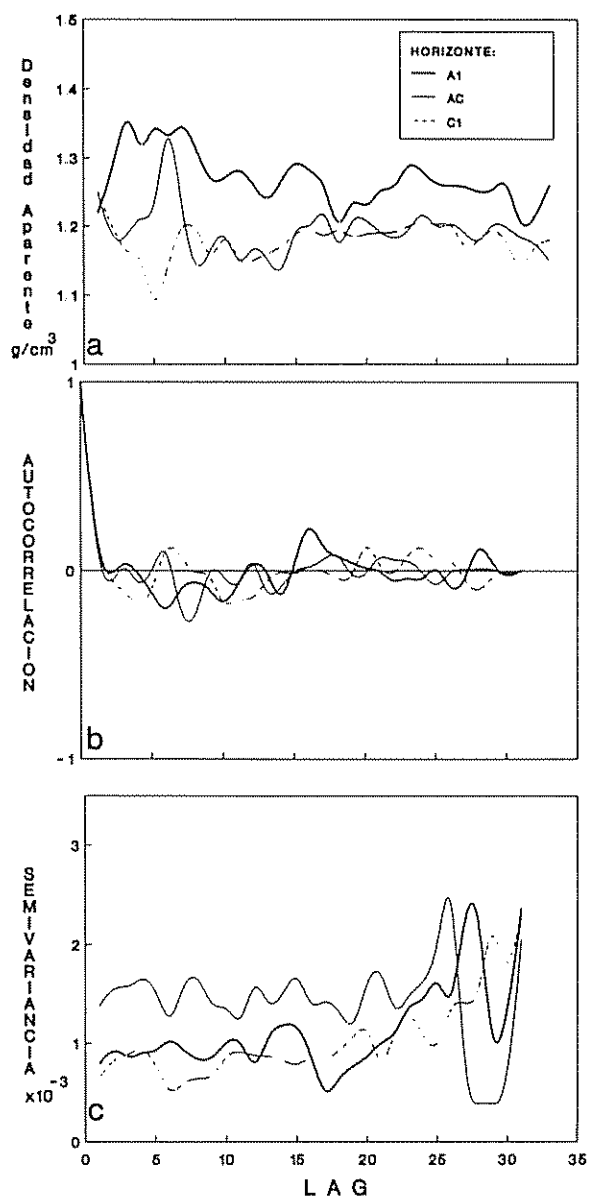


Fig. 4 a) Serie de datos de densidad aparente; b) autocorrelograma y c) semivariograma, obtenidos a partir de 33 muestras de suelo separadas 0.30 m entre sí (Lag), para los horizontes A1, AC y C1ca (transecta radial a la copa de un ejemplar de *Prosopis* sp.)

lidad es máxima en A1 y apreciablemente menor en AC y C1ca.

Tanto el autocorrelograma (Fig. 4b) como el semivariograma (Fig. 4c) indican una total falta de estructura en la distribución de esta variable en el espacio. Este hecho fue detectado por Kachanoski *et al.* (3), pero contrasta con lo citado por Trangmar *et al.* (6).

CONCLUSIONES

En el suelo estudiado, y en las condiciones de muestreo en posiciones bajo y fuera del árbol, las variables materia orgánica, pH y densidad aparente poseen un comportamiento altamente estocástico.

En consecuencia, la dependencia espacial es sumamente baja: no excede los 2 m en materia orgánica; llega a 0.60 m en el pH de los horizontes subsuperficiales; es totalmente inexistente en el pH superficial y en la densidad aparente de los tres primeros horizontes del perfil.

En el suelo analizado, y en situación de estudio bajo y fuera del árbol, el muestreo para la evaluación de materia orgánica y del subsuperficial debe ser dirigido o sistemático, siempre y cuando la distancia horizontal no supere 2 m ó 0.60 m, respectivamente; en caso contrario debe recurrirse a la toma de muestras al azar, en un número mínimo estimado según la estadística clásica.

Para el estudio de pH superficial y densidad aparente, es también conveniente el empleo de muestras extraídas al azar.

LITERATURA CITADA

- 1 BACHMEIER, O A ; BUFFA, E V ; PEÑAZUBIATE, C ; SERPA, P. 1988. Mapa de suelos del área experimental de la Reserva Natural "Los Pocitos" - Chancaní. Jornadas de Investigación de la Facultad de Ciencias Agropecuarias (2.) Resúmenes. Arg., UNC p. 36
- 2 KACHANOSKI, R.G ; ROLSTON, D.E.; DE JONG, E. 1985a. Spatial and spectral relationships of soil properties and microtopography. I Density and thickness of A horizon. Soil Science Society of American Journal 49:804-812.
- 3 KACHANOSKI, R.G ; ROLSTON, D.E.; DE JONG, E. 1985b. Spatial variability of a cultivated soil as affected by past and present microtopography. Soil Science Society American Journal 49:1082-1987.

-
4. KNIGHTON, R.E.; JAMES, D.W. 1985. Soil test phosphorous as a regionalized variable in levelled land. *Soil Science Society of American Journal* 49:675-679
 5. RUSSO, D. 1983. Design of an optimal sampling network for estimating the variogram. *Soil Science Society of American Journal* 48:708-716.
 6. TRANGMAR, B.B.; YOST, R.S.; UEHARA, G. 1985. Application of geoestadistics to spatial studies of soil properties. *Advances in Agronomy* 38:45-94
 7. TRANGMAR, B.B.; YOST, R.S.; UEHARA, G. 1986. Spatial dependence and interpolation of soil properties in West Sumatra, Indonesia. I. Anisotropic variation. *Soil Science Society of American Journal* 50:1391-1395.
 8. VIEIRA, S.R.; HATFIELD, J.L.; NIELSEN, D.R.; BIGGAR, J.W. 1983. Geostatistical theory and application to variability of some agronomical properties. *Hilgardia* 51(3):73

Viabilidade das Sementes de *Tibouchina urvilleana* (DC) Cogn. (Melastomataceae)¹

K H. Kraemer*, A N. Kämpf*, M E. Alves Aquila**

ABSTRACT

Tibouchina urvilleana is an ornamental native shrub known as "princess flower" with violet flowers blooming over a long period of time, cultivated in Brazilian gardens and as a potplant in Europe. This study was conducted at Federal University of Rio Grande do Sul, in Porto Alegre/RS/Brazil, and aimed at determining seed viability. Seeds collected on March 10, 1988, were tested monthly, over an 18 month period, in Petri dishes with filter paper and distilled water. Seeds were kept in germinators at 26 (± 1)°C and a 12 hour photoperiod. Results showed a high seed germination (92% to 95%) during the 18-month period. However, average germination time (t) increased from 5.7 at the beginning to 7.1 days by the end of the experiment.

Key words: Germination, seeds, *Tibouchina*, ornamental plants, viability.

RESUMO

Tibouchina urvilleana é um arbusto ornamental nativo cuja floração roxa dura um longo período, sendo cultivado no Brasil para uso em jardins ou como planta de vaso, na Europa. Com o objetivo de conhecer a viabilidade de suas sementes, foi realizado um experimento unifatorial, conduzido na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em Porto Alegre/RS/Brasil. De um lote colhido em 10/03/88 e armazenado em condições ambientais, as sementes foram testadas mensalmente em germinador, colocadas em placas de Petri, com papel filtro e água destilada. Foi mantida temperatura constante de 26 (± 1)°C e fotoperíodo de 12 horas. A germinabilidade das sementes manteve-se alta (92% a 95%) durante o período observado. Entretanto, o tempo médio de germinação aumentou de 5.7 para 7.1 dias.

Palavras-chave: Germinação, sementes, *Tibouchina*, flora ornamental, viabilidade

INTRODUÇÃO

O presente trabalho integra uma linha de pesquisa desenvolvida na Universidade Federal do Rio Grande do Sul/Brasil, sobre o cultivo de espécies nativas com valor ornamental.

Dentro deste contexto, *Tibouchina urvilleana* está sendo estudada quanto à germinação vegetativa e tratos culturais.

A família Melastomataceae contribui para a flora ornamental com um grande número de espécies de vários gêneros. O gênero *Tibouchina* se destaca, apresentando espécies arbóreas, arbustivas e também herbáceas. Na Europa, *T. urvilleana* é espécie apreciada para uso em terraços ou jardins de inverno, geralmente plantada em vasos (3, 4). No Rio Grande do

Sul, *T. urvilleana* é um arbusto encontrado nativo ou cultivado em jardins; atinge 3 m de altura; é conhecido popularmente como "orelha-de-onça" ou "quaresmeira". Suas folhas são ovais e aveludadas e as flores roxas estão presentes de dezembro a julho (9). Calcula-se que em um quilograma encontrem-se cerca de 43.5 milhões de sementes.

Num primeiro experimento, testou-se a germinação das sementes sob três temperaturas (10°C, 20°C e 30°C), na presença e na ausência de luz (5). A germinação ocorreu somente na presença de luz, a 20°C e a 30°C (91.5% e 95%, n.s.). Houve diferença significativa entre o tempo médio de germinação a 20°C (5.8 dias) e a 30°C (4.5 dias). Com base nestes dados, este estudo foi organizado como o objetivo de determinar a longevidade das sementes de *T. urvilleana* para uso em viveiros comerciais.

Entende-se como longevidade o período de tempo que uma semente se mantém viável quando armazenada sob condições ideais. Viabilidade é a capacidade da semente germinar, que varia em função de características genéticas, do vigor fisiológico da planta progenitora, das condições climáticas predominantes durante a maturação e das condições ambientais que acompanham a semente durante a estocagem (2). O período de

¹ Recebido para publicação em 22 abril de 1991. Trabalho extraído da dissertação de Mestrado da primeira autora (bolsista da CAPES/Brasil).

* Departamento de Horticultura e Silvicultura, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 7712 - 91500 - Porto Alegre/RS/Bra.

** Departamento de Botânica/UFRGS; Av. Paulo Gama, anexo 12/105 - 90049 - Porto Alegre/RS/Bra

viabilidade pode variar desde alguns dias, como as sementes de uma espécie de bordo, *Acer saccharinum*, em condições naturais (Jones, citado por (6)), até milhares de anos, como as sementes de *Lupinus arcticus* Wats (8).

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido nos Laboratórios de Fitopatologia (Faculdade de Agronomia) e de Fisiologia Vegetal (Departamento de Botânica) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, de abril/1988 a outubro/1989. A seleção e a pesagem das sementes foram realizadas no Laboratório de Tecnologia de Sementes do Instituto de Pesquisas Agronômicas (IPAGRO) da Secretaria da Agricultura do Estado do Rio Grande do Sul. A determinação do grau de umidade das sementes foi feita no Laboratório de Solos da Faculdade de Agronomia/UFRGS.

Frutos maduros de duas plantas de um mesmo clone da coleção da Faculdade de Agronomia foram coletados em 10/03/88 e acondicionados em sacos de papel. As cápsulas foram secas ao ar e as sementes peneiradas, utilizando-se para o estudo aquelas retidas entre as malhas 0.50 e 0.25 mm, as quais foram armazenadas em frascos de vidro, em condições ambientais. O grau de umidade das sementes foi determinado pelo método de estufa a 105 (± 3)°C, durante 24 h, de acordo como as Regras para Análise de Sementes (1). Com 7% de umidade, mil sementes pesaram 0.023 g.

Para germinação, as sementes foram colocadas em placas de Petri de 6 cm de diâmetro, forradas com papel filtro umedecido com água destilada, em germinadores com fotoperíodo de 12 h (4 lâmpadas fluorescentes Luz do Dia Plus/Sylvania - 20 W) e temperatura constante de 26 (± 1)°C.

O experimento foi disposto em delineamento completamente casualizado, com 8 repetições, 50 sementes por parcela (400 sementes por tratamento), totalizando 7200 sementes. Cada placa de Petri constituiu uma parcela. Os 18 tratamentos corresponderam aos períodos de armazenamento das sementes, iniciando-se aos dois meses e concluindo-se aos 19 meses. Foram avaliados os seguintes parâmetros: a) germinabilidade: percentagem total de germinação; b) tempo médio de germinação (t): calculado de acordo com Labouriau (6), pela fórmula:

$$\bar{t} = \sum n_i t_i / \sum n_i$$

onde:

n_i = número de sementes germinadas em t_i ;

t_i = intervalo de tempo decorrido entre cada observação.

A partir da sementeira, foram feitas contagens diárias das plântulas emergentes por placa, durante 12 dias, para cada tratamento. Considerou-se germinada a semente cujas folhas cotiledonares estivessem aparecendo por baixo do tegumento (Fig. 1g), de acordo como o critério agrônomo de germinação. As sementes germinadas foram retiradas. Este procedimento foi repetido mensalmente.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, a significância das diferenças entre as médias foi determinada pelo teste de Tukey ($P < 5\%$) e o erro experimental foi avaliado pelo coeficiente de variação (CV) e pela diferença mínimo significativa relativa (DMSr). Calcula-sea DMSr de acordo com Lange (7), pela fórmula:

$$DMSr = (DMS/X) \times 100$$

onde:

DMS = diferença mínima significativa pelo teste T ($P < 5\%$);

X = média dos resultados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A percentagem total de germinação manteve-se alta durante os 18 meses do experimento, variando de 92% e 95%, sem diferença significativa (Quadro 1). Apesar desta resposta homogênea, observa-se aumento progressivo no tempo médio de germinação. Quanto a este aspecto, identificam-se três grupos entre os tratamentos: primeiramente, o grupo que germinou mais rápido (5.5 a 5.8 dias), abrangendo os tratamentos 1 a 8, exceto 3; o grupo intermediário (6.2 a 6.8 dias) nos tratamentos 9 a 13 e, por último, o grupo de germinação mais lenta (7.0 a 7.3 dias), nos tratamentos 14 a 18 (Quadro 1). O aumento no tempo médio de germinação alcançou 25%, iniciando em torno de 5.7 dias (média do 2º ao 9º mês após a coleta), chegando a 7.1 dias (média do 15º ao 19º mês).

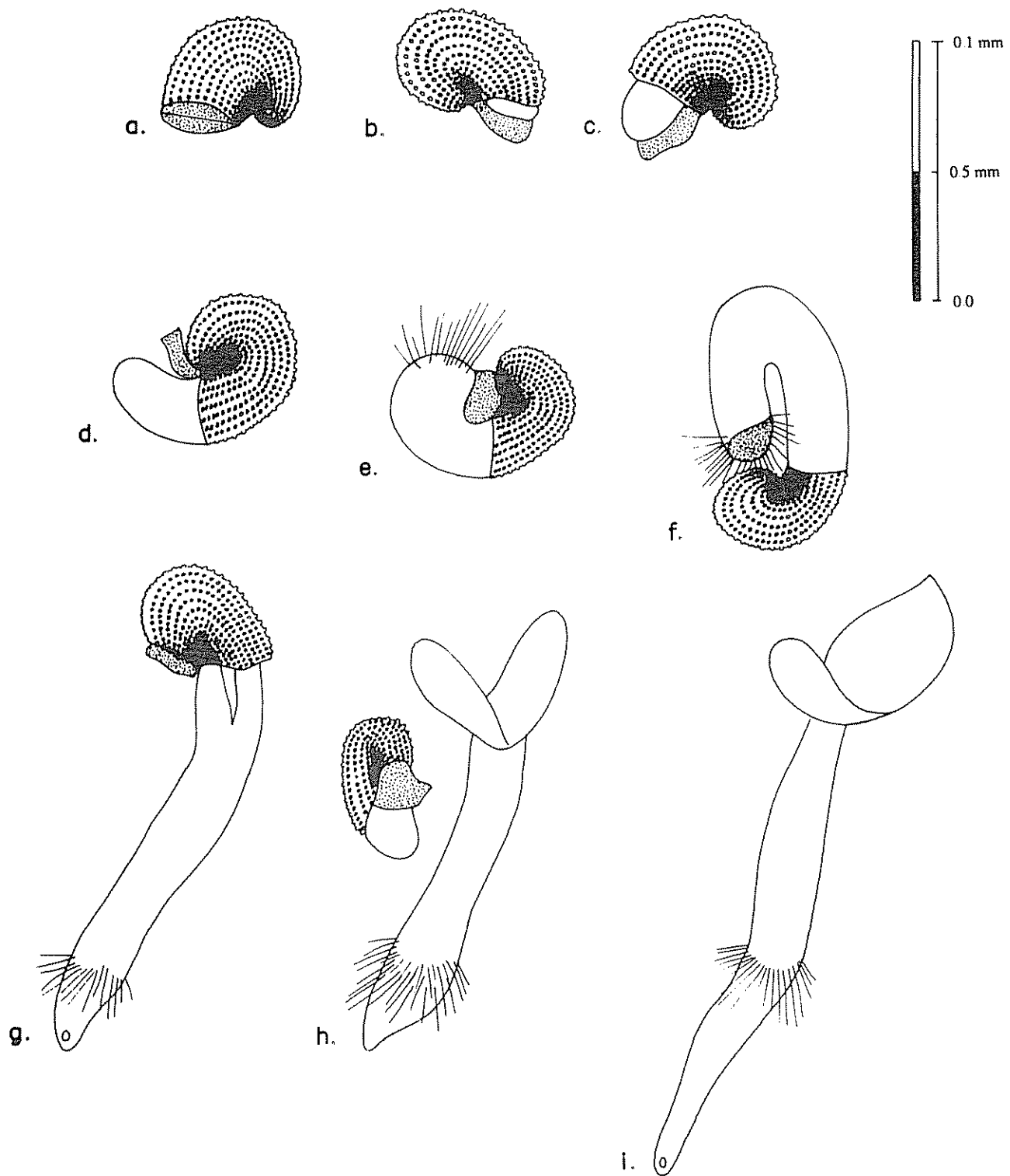


Fig. 1. Fases da germinação de *T. urvilleana*: a,b) semente embebida; c,d,e) emergência da radícula; f) formação do gancho hipocotilar; g) surgimento das folhas cotiledonares; h,i) plântulas em desenvolvimento

Quadro 1. Viabilidade das sementes de *T. urvilleana* ao longo de 18 meses: Germinação total e tempo médio de germinação sob condições controladas (26°C, 12/12 h luz); médias de 8 repetições, n = 400.

| Tratamento (n°) | Meses após a coleta | Germinação total (%) | Tempo médio de germinação (dias) |
|-----------------|---------------------|----------------------|----------------------------------|
| 1 | 2 | 92.75 ns* | 5.82 a |
| 2 | 3 | 93.75 | 5.78 a |
| 3 | 4 | 94.25 | 6.29 b |
| 4 | 5 | 94.00 | 5.49 a |
| 5 | 6 | 92.00 | 5.81 a |
| 6 | 7 | 91.50 | 5.55 a |
| 7 | 8 | 93.50 | 5.57 a |
| 8 | 9 | 94.75 | 5.61 a |
| 9 | 10 | 94.50 | 6.44 bcd |
| 10 | 11 | 91.50 | 6.42 bc |
| 11 | 12 | 93.00 | 6.18 b |
| 12 | 13 | 93.75 | 6.67 cd |
| 13 | 14 | 94.75 | 6.77 de |
| 14 | 15 | 93.75 | 7.29 f |
| 15 | 16 | 94.00 | 7.08 ef |
| 16 | 17 | 93.25 | 7.02 ef |
| 17 | 18 | 93.00 | 7.05 ef |
| 18 | 19 | 93.75 | 7.13 f |
| CV | | 3.60 | 3.03 |
| DMSr (%) | | 3.57 | 3.00 |

*ns = não significativo; médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<5%)

Em termos de produção comercial, entretanto, tais diferenças não são consideráveis e os dados atestam a alta viabilidade das sementes de *T. urvilleana* até, no mínimo, 19 meses após coletadas.

O tratamento 3 (quatro meses após a coleta) apresentou tempo médio de germinação mais longo do que o esperado, tomando-se por base os tratamentos mais próximos. Essa alteração é provavelmente decorrência de uma falha técnica na manutenção da temperatura no ambiente do experimento, por falta de energia elétrica no laboratório. Neste tratamento foi observado, diferentemente dos demais, que a radícula das sementes germinadas apresentava coloração rosada.

CONCLUSÕES

- As sementes de *T. urvilleana* apresentam alta viabilidade, comprovada até 19 meses após a coleta.
- Pelas características positivas, esta espécie apresenta potencial para produção comercial da planta e das sementes.

LITERATURA CITADA

1. BRASIL. MINISTERIO DA AGRICULTURA. SECRETARIA NACIONAL DE DEFESA AGROPECUARIA. 1980. Regras para análise de sementes. Brasília, Ministério da Agricultura p. 188.
2. CARVALHO, N M.; NAKAGAWA, J. 1983. Sementes: Ciência, tecnologia e produção. Campinas, Cargil. 429 p.
3. HEITZ, H. 1986. Als war's ein Stück vom sonnigen Süden: Mein Schöner Garten. (Berlin) 15(4):134-141.
4. KÖCHEL, C.; KÖCHEL, M. 1987. Die Schönsten Kubelpflanzen. Munique, Verlag. p. 119-120.
5. KRAEMER, K H.; KÄMP, A N.; AQUILA, M.E A. 1989. Influência da luz e da temperatura na germinação de *Tibouchina urvilleana* (DC) Cogn. (Melastomataceae). In Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais (7, 1989) Resumos. Viçosa/MG, UFV. p. 13.
6. LABOURIAU, L.G. 1983. A germinação das sementes. Washington, Secretaria Geral da OEA. 174 p.
7. LANGE, P. 1978. Beeinflussung des wachstumsverlaufes bei *Euphorbia pulcherrima* "Anette Hegg" durch Cycocel-Gaben. Angewandte Botanik (Berlin) 52:171-183.
8. PORSILD, A.E.; HARRINGTON, C.R.; MULLIGAN, G.A. 1967. *Lupinus arcticus* Wars. grown from seeds of Pleistocene Age. Science 15:113-114.
9. SOUZA, M.L.D.R. 1984. Estudo taxonômico do gênero *Tibouchina* Aubl. (Melastomataceae) no Rio Grande do Sul. Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas-Botânica Sistemática. (Não publicada) Porto Alegre, UFRGS. 153 p.

Biochemical Markers of Variety in *Cocos nucifera* L. from Yucatan¹

B. Canto-Canché*, E. Quintal-Salazar*, M.A. Villanueva **

ABSTRACT

Isozyme and protein patterns were studied in local varieties of *Cocos nucifera* from Yucatan. Two acid phosphatases, two esterases, one malate dehydrogenase, and one alcohol dehydrogenase, were detected in extracts from inflorescences by isoelectrofocusing, and observed to be monomorphic for the four varieties tested: Atlantic Tall, and Malayan Green, Red, and Yellow Dwarves. Five acid phosphatases, three esterases, four malate dehydrogenases and four alcohol dehydrogenases were also found to be monomorphic for all four varieties in leaf tissue. Peroxidase isozyme patterns from both types of extracts were variable among the varieties, but this was due to unknown factors other than the genotype variety. However, analysis of the coconut endosperm of the dwarf varieties consistently revealed a peroxidase of pI ~ 4, and a silver-stained protein band of the same pI. Both of these were greatly diminished in the tall variety. Finally, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis revealed two polypeptides of Mr ~ 18 000 and 38 000 that were present in the three dwarf varieties, but greatly diminished in the tall variety. These results indicate that, although the dwarf and the tall varieties of coconut are closely related, there are slight differences that permit a clear biochemical distinction between the Malayan Dwarves and the Atlantic Tall trees.

Key words: Coconut, lethal yellowing, protein markers, isozymes, endosperm.

COMPENDIO

Se analizaron patrones de proteínas o isoenzimas en variedades locales de *Cocos nucifera* de Yucatán. Se detectaron dos fosfatasa ácidas, dos esterases, una malato y una alcohol dehidrogenasa, en extractos de inflorescencias después del isoelectrofoque. Estas actividades fueron monomórficas en las variedades estudiadas: Alto del Atlántico y enanos malayos Verde, Rojo y Amarillo. En el tejido proveniente de hojas, cinco fosfatasa ácidas, tres esterases, cuatro malatos y cuatro alcoholes dehidrogenasas fueron también monomórficos para todas las variedades. Los patrones de peroxidasa, en ambos tipos de extracto, fueron variables entre variedades, pero debido a factores diferentes del genótipo. Contrariamente, el análisis del endospermo de las tres variedades enanas mostró consistentemente una peroxidasa de pI ~ 4 y una proteína detectada con tinción de plata con idéntica movilidad. Ambas fueron muy débilmente detectables en la variedad Alto del Atlántico. Finalmente, una electroforesis disociante en geles de poliacrilamida mostró dos polipéptidos de Mr ~ 18 000 y 38 000 que estuvieron presentes en las tres variedades enanas pero disminuidas en Alto del Atlántico. Estos resultados indican que, aunque ésta como las enanas están íntimamente relacionadas, existen diferencias bioquímicas que permiten una clara distinción desde ese punto de vista entre ellas.

INTRODUCTION

Cocos *nucifera* is a crop with a world-wide distribution that predominates in the tropics. The modern pattern of distribution of the different varieties is due to the movement of the seeds from their center of origin to Africa and the

American continent (6, 11) by the Spanish, Portuguese and Chinese (7, 14). Mexico has a rich source of germ plasm variation that still remains to be defined, and efforts have already been started (19). Classification of existing germ plasm in Mexico has been carried out through the measurement of physiological parameters (i.e., fruit form, husk/meat ratio, etc.). These methods would be greatly complemented if biochemical markers for the varieties were available to aid in the establishment of germ plasm identities and interrelationships. This characterization is even more important in view of the spread of lethal yellowing (LY) disease in Mexico (4) from the Caribbean coast. In Jamaica, LY affected coconut varieties differentially; Malayan Dwarf showed almost 100% resistance (Zizumbo Villarreal, pers. comm.), Panama Tall close to 50% (20), and Jamaica or Atlantic Tall almost no resistance (20). With

¹ Received for publication 20 February 1992.

This work was partly supported by grant D112-904515 from the National Council of Science and Technology (CONACYT), and by institutional funds from the *Centro de Investigación Científica de Yucatán*, A.C. We thank M.S.D. Zizumbo for helpful discussions and information. This work is also a part of the requirements for the B.S. degree of E. Q.-S.

* *Centro de Investigación Científica de Yucatán*, A.C. P.O. Box 87, Cordemex 97310, Merida, Yucatán, Méx.

** Department of Biology, Texas A & M University, College Station, TX 77843-3258, USA.

these data, one could predict the impact of the disease on a plantation if the origin and identity of the materials were clearly established.

It is shown here that, although the Dwarf and Tall varieties are closely interrelated in Yucatan, one can distinguish the Malayan Dwarf varieties from the Atlantic Tall variety through the biochemical analysis of protein and isozyme patterns.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

All dwarf varieties were collected from commercial plantations located in San Crisanto, Yucatan. The tall variety was collected from different plantations along the coast of Yucatan where LY symptoms were absent (4). The internal rachillae from the oldest unopened inflorescences and basal pinnae from basal leaves were used for the analysis. In addition, mature fruits were collected from all varieties following the criteria described by Harries (6), and from which the solid endosperm was used for the analyses.

Tissue extractions

Two tissue extraction methods were employed. Nondenaturing extraction methods were carried out by grinding 1 g of tissue in 1 ml of 10% (v/v) glycerol, 1 mM sodium ascorbate, 3 mM L-cysteine, 10 mM Tris-HCl, pH 6.0, in a mortar and pestle at 4°C. The homogenates were centrifuged at 14 000 x g, for 5 min at 4°C and the supernatants stored at -70°C until analyzed. Denaturing extractions were performed by a modification of the procedure of Wu and Wang (18). One gram of tissue was frozen with liquid nitrogen and ground in a mortar and pestle to a fine powder. The powder was added to 10 vol of 10% (v/v) trichloroacetic acid (TCA) and incubated 30 min in darkness. After incubation, the slurry was filtered through two layers of cheese-cloth and the flowthrough was centrifuged at 27 000 x g, for 15 min at 4°C. The pellet was washed three times by resuspension in 1:1 ethanol-ether and recentrifuged at 27 000 x g. Proteins in the pellet were resolubilized in 1% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS), 1.5 mM B-mercaptoethanol, 10% (v/v) glycerol, 10 mM Tris-HCl, pH 6.8, and the 27 000 x g supernatant collected for further analysis.

Protein determination

The protein content in the extracts was determined by the method of Markwell *et al.* (9), which is designed to detect the presence of SDS in the samples.

Isoelectrofocusing-polyacrylamide gel electrophoresis

Isoelectrofocusing-polyacrylamide gel electrophoresis (IEF-PAGE) was carried out by blotting the nondenatured extracts on to 5 x 10 mm squares of Whatman paper and placing them on LKB isoelectrofocusing polyacrylamide gels (LKB Bromma) with ampholytes with a pH range of 3.5 to 9.5. The gels were run at 400 v, 25 mA, for 2 h 30 minutes. Enzyme activities were detected on the gels as follows: esterases, according to Shaw and Prasad (12); acid phosphatases, Scandalios (13); peroxidases, Villanueva and Malek-Hedayat (15); malate (MDH) and alcohol (ADH) dehydrogenases, Brown, Zohary, and Nevo (3); and phosphoglucosyltransferases (PGT), Vallejos (16).

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

Samples for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) were adjusted to 2.3% (w/v) SDS, 5% (v/v) B-mercaptoethanol, 10% (v/v) glycerol, 10 mM Tris-HCl, pH 6.8, and boiled for 5 minutes. The samples were run on 15% polyacrylamide gels according to Laemmli (8). The proteins were stained with 0.1% (w/v) Brilliant Coomassie Blue in 5:5:2 water-methanol-acetic acid (10), or with ammoniacal silver (17).

RESULTS

Although minor bands sometimes appeared in the gel patterns, our assessment of differences among the varieties were focused on major, reproducible bands.

The pattern of the four enzyme activities in inflorescence extracts analyzed by IEF-PAGE was identical for all four varieties studied. The acid phosphatase isozymes consistently showed two bands with enzymatic activity in all four varieties studied (Table 1), although one band of pI~4 showed inconsistently in either the Malayan Green or the Malayan Red Dwarf

varieties (data not shown). The esterase isozymes also showed an identical pattern of two bands in all four varieties analyzed (Table 1), but only one ADH and one MDH with identical pIs were detected (Table 1). The activity of peroxidase isozymes was also studied in the same extracts, but the patterns were very different in each of five experiments (data not shown), suggesting that, rather than polymorphism due to variety, external factors influenced the expression of these enzyme activities.

Table 1. Isoelectric points of acid phosphatases, esterases, MDH and ADH from inflorescence extracts of different varieties of *Cocos nucifera* from Yucatan.

| | acid phosphatase | esterases | MDH | ADH |
|----------------------|------------------|-----------|-----|-----|
| Malayan Yellow Dwarf | 6.6, 6.9 | 6, 6.9 | 6.9 | 6.9 |
| Malayan Green Dwarf | 6.6, 6.9 | 6, 6.9 | 6.9 | 6.9 |
| Malayan Red Dwarf | 6.6, 6.9 | 6, 6.9 | 6.9 | 6.9 |
| Atlantic Tall | 6.6, 6.9 | 6, 6.9 | 6.9 | 6.9 |

The same enzyme activities were analyzed in extracts of pinnae from leaves. Although the number of major bands varied in some cases compared to the ones detected in inflorescence extracts, the patterns of MDH, ADH, esterases and acid phosphatases were identical in all four varieties analyzed (Table 2). Five acid phosphatase bands were observed in all four varieties (Table 2). Contrary to the inflorescence extract patterns, three esterase bands consistently observed in the leaf extracts of the four varieties analyzed (Table 2). Finally, four bands with ADH and MDH activities with identical pIs were detected in all four varieties (Table 2). The proteins with peroxidase activity in these extracts were also irreproducible in all four varieties tested.

Table 2. Isoelectric points of acid phosphatases, esterases, MDH and ADH from leaf extracts of different varieties of *Cocos nucifera* from Yucatan.

| | acid phosphatase | esterases | MDH | ADH |
|---------------------------------------|------------------|-----------|-----------|----------|
| Malayan Dwarves | 2.6, 6.6, | 6.8, 7.1, | 2.9, 6.9, | 3.0, 6.7 |
| All varieties (Yellow, Green, Red) | 7.0, 7.3, 7.5 | 7.4 | 7.3, 7.5 | 7.2, 7.5 |
| Atlantic Tall | 2.6, 6.6 | 6.8, 7.1 | 2.9, 6.9 | 3.0, 6.7 |
| | 7.0, 7.3 | 7.4 | 7.3, 7.5 | 7.2, 7.5 |
| | 7.5 | | | |

Due to the high degree of monomorphism found with the enzyme activities tested in inflorescence and leaf extracts, and the high variation that the peroxidase activities displayed, analysis was focused on fruit endosperm, since it is the organ with the most constant physiological stage at maturity. Mature fruits of all four varieties were analyzed and selected according to the criteria described by Harries (6). The extracts from the endosperm were extracted under non-denaturing conditions and analyzed by IEF-PAGE. The resulting gels were incubated in substrates to detect PGI and peroxidase activities. The pattern obtained for the PGI activities was identical for all four varieties analyzed (Fig. 1).

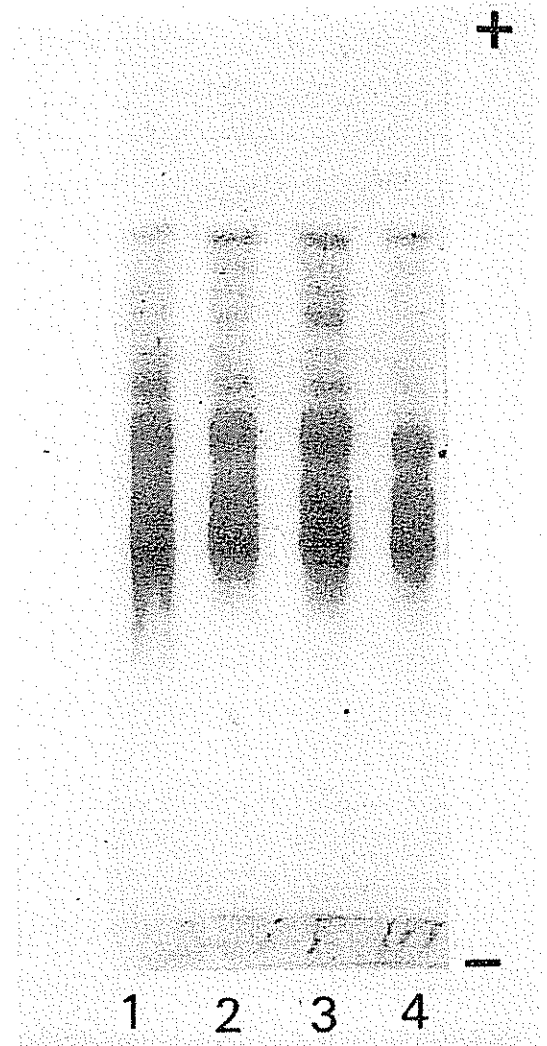


Fig. 1. Isozyme pattern of phosphogluco-isomerase activities from mature solid endosperm from *Cocos nucifera* after isoelectric focusing on polyacrylamide gels. The lanes correspond to extracts from the varieties: 1, Atlantic Tall; 2, Malayan Red Dwarf; 3, Malayan Green Dwarf; and 4, Malayan Yellow Dwarf. The symbols represent the acidic (+), and basic (-) ends of the gel.

However, the peroxidase activity pattern showed a band with a $pI \sim 4$ that was present only in the three Malayan Dwarf extracts (Fig. 2, lanes 1-3), and completely absent in the Tall variety (Fig. 2, lane 4). This pattern was consistent in five independent experiments. In a parallel analysis, IEF-PAGE gels were stained with ammoniacal silver to detect total protein. A protein band of $pI \sim 4$ that was present in all three Malayan Dwarf varieties was again observed (Fig. 3, lanes 1-3), but absent in the Tall variety (Fig. 3, lane 4). It is important to note that all three Malayan Dwarf varieties had identical patterns in all the analyses.



Fig. 2. Isozyme pattern of peroxidase activities from mature solid endosperm from *Cocos nucifera* after isoelectric focusing on polyacrylamide gels. The lanes correspond to extracts from the varieties: 1, Atlantic Tall; 2, Malayan Red Dwarf; 3, Malayan Green Dwarf; and 4, Malayan Yellow Dwarf. The arrow indicates the position of electrofocusing of a protein of $pI \sim 4.0$. The symbols represent the acidic (+), and basic (-) ends of the gel

In addition to the analysis carried out by IEF-PAGE, differences at the level of total protein on SDS-PAGE gels were studied. The proteins were run and stained with Coomassie Blue. The analysis showed consistency in the protein patterns of the Malayan Dwarf varieties; however, all three varieties consistently showed two polypeptides of $M_r \sim 18\,000$ and $38\,000$ (Fig. 4, lanes 2-4) that were almost not able to be detected in the Tall variety (Fig. 4, lane 1).

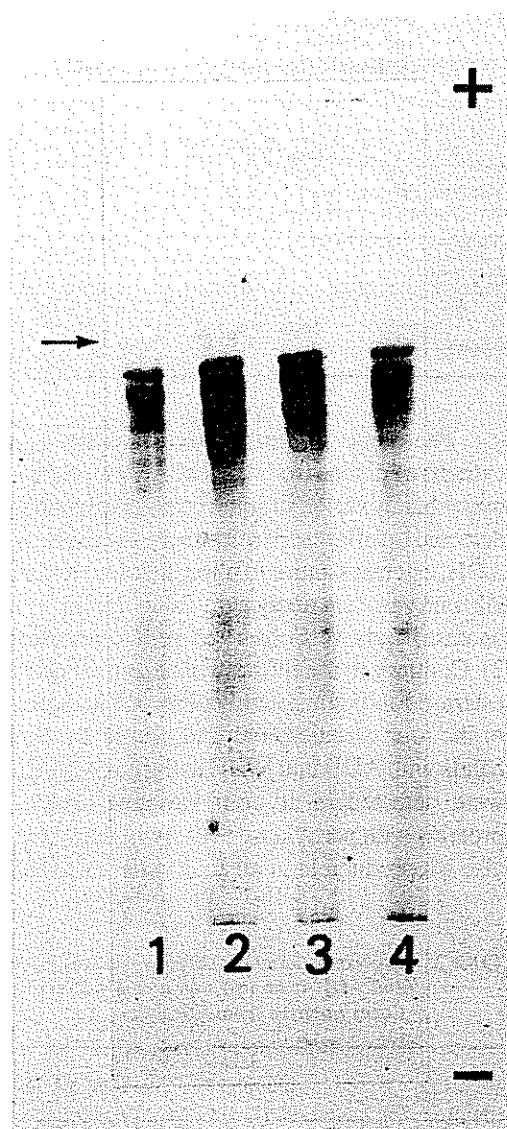


Fig. 3. Total protein pattern from mature solid endosperm from *Cocos nucifera* after isoelectric focusing on polyacrylamide gels, and subsequent silver staining. The lanes correspond to extracts from the varieties: 1, Malayan Yellow Dwarf; 2, Malayan Green Dwarf; 3, Malayan Red Dwarf; and 4, Atlantic Tall. The arrow indicates the position of electrofocusing of a protein of $pI \sim 4.0$. The symbols represent the acidic (+), and basic (-) ends of the gel

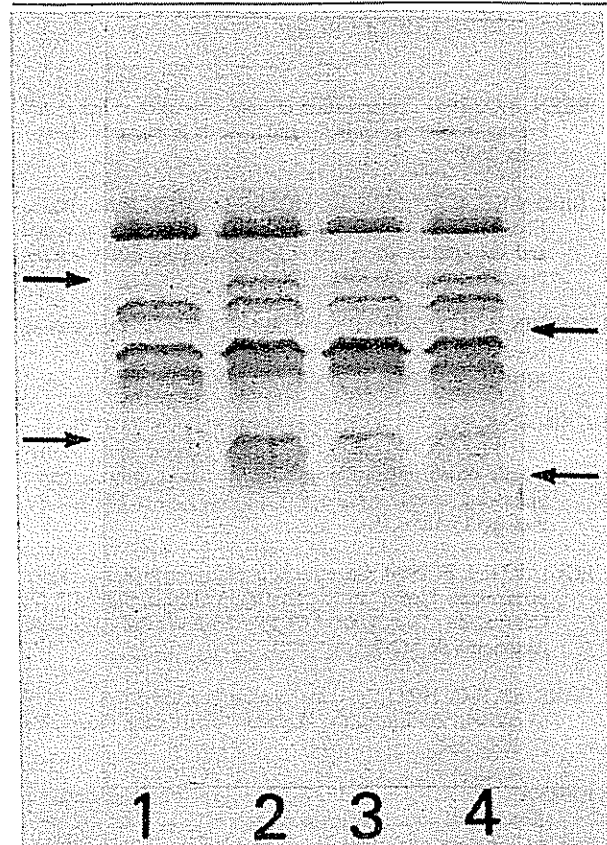


Fig. 4. Total protein pattern from mature solid endosperm from *Cocos nucifera* after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, and subsequent coomassie blue staining. The lanes correspond to extracts from the varieties: 1, Atlantic Tall; 2, Malayan Red Dwarf; 3, Malayan Yellow Dwarf; and 4, Malayan Green Dwarf. The arrows on the right indicate, from top to bottom, the molecular weight markers: carbonic anhydrase, 29 000; cytochrome c, 13 000. The arrows on the left indicate, from top to bottom, proteins with a relative mobility of 38 000, and 18 000.

Results demonstrate a close interrelationship among all four varieties of coconut, especially among the Malayan Dwarf varieties. However, slight differences in the protein expression allow the researcher to distinguish between a Malayan Dwarf and an Atlantic Tall tree.

DISCUSSION

Among the varieties of *Cocos nucifera* in Yucatan, the Malayan Dwarf and the Atlantic Tall varieties predominate. In addition to the phenotype, biochemical criteria for the assessment of the particular variety are necessary. Further, a catalog of biochemical markers can be most helpful in the establishment of a taxonomical system that will allow the classification of all existing germ plasm in Mexico.

In this study, the existence of such biochemical markers of variety in the coconut trees that predominate in the coast of Yucatan were sought. Two types of analyses were carried out: one to determine isozyme patterns in the four varieties mentioned, in order to observe differences in the expression of these proteins; the other, to look for differences at the level of total proteins, both under nondenaturing and denaturing conditions.

Analysis of isoenzyme patterns in both inflorescence and leaf extracts showed that in all four varieties of coconut the expression of these proteins is well conserved, indicating a close evolutionary interrelationship. The acid phosphatases and the esterases showed a similar pattern in the extracts from inflorescences, suggesting that they may be equivalent enzyme activities, as esterases have a broad substrate specificity (13). On the other hand, the ADH and MDH identical isozyme patterns may be distinct proteins, unless they are the result of general dehydrogenase activities with a broad substrate specificity. The peroxidase activities seemed to show a high degree of polymorphism at first, but subsequent experiments showed that the patterns were not consistent. This suggests that the expression of these enzymes is highly influenced by external factors and/or the physiological stage of the plant. Due to this, and based on a previous report of taxonomical studies carried out on the Palmaceae plant, *Astrocaryum mexicanum* (5), analyses were focused on fruit which was less susceptible to variation in protein expression due to external factors.

Since all four enzyme activities except peroxidases, presented monomorphism, the analysis of the activities of PGIs and peroxidases by IEF-PAGE in fruit endosperm was chosen. In five independent experiments, it was found that the PGI activity bands were identical in the four varieties analyzed. However, the peroxidase activities, although identical in all three Malayan Dwarf varieties, showed an activity band of pI-4 that was present in the dwarves but absent in the tall variety. A similar result was obtained when total protein was analyzed in parallel gels; a protein band of pI-4 was also detected in all three Malayan Dwarf varieties, but was absent in the tall variety. Although they have similar pIs, we do not know whether the protein detected by the silver stain is the same one that displays peroxidase activity.

Alternatively, the analysis on SDS-PAGE gels of the total proteins of all four varieties under denaturing

conditions showed an identical pattern in the three Malayan Dwarf varieties; however, two polypeptides of Mrs 18 000 and 38 000 were virtually absent in the tall variety.

Our results indicate that the four varieties of *C. nucifera* are closely interrelated, with the tall variety diverging slightly in the expression of some proteins. We do not know that the significance of extra proteins in dwarf varieties is, although we might speculate that, for example, the extra peroxidase activity provides protection against the attack of pathogens (2). This initial finding of biochemical differences between dwarf and tall varieties of *C. nucifera* indicates that differences among varieties and ecotypes can be established further by two-dimensional gel electrophoresis or by molecular analysis at the gene level. In addition, these data could be used to certify either Malayan Dwarf or Atlantic Tall trees, as well as establish a taxonomical catalog for coconut varieties in Mexico.

CONCLUSIONS

1. IEF-PAGE analysis of leaf and inflorescence extracts yielded acid phosphatase, esterase, malate dehydrogenase, and alcohol dehydrogenase isozymes which were monomorphic in Atlantic Tall, and Malayan Red, Green and Yellow Dwarf varieties of coconut from Yucatan.
2. IEF' and SDS-PAGE analyses from fruit endosperm extracts showed that the Atlantic Tall can be distinguished from the three Malayan Dwarf varieties by the following: a) a peroxidase of pI=4 predominantly present in the Malayan dwarves; b) a silver-stained polypeptide of the same pI also present in the dwarf varieties; and c) two polypeptides of Mrs=18 000 and 28 000 predominantly present in the dwarf varieties.
3. Malayan Red, Green and Yellow Dwarf varieties were indistinguishable among themselves by any of the analytical procedures.
4. Although all four varieties are closely related, slight differences in their isozyme and protein patterns could be detected (i.e., one protein band by IEF page and two by SDS-PAGE), which suggests that further analysis could be used for classification of other varieties.

LITERATURE CITED

- 1 BEEN, B O 1981 Observation of field resistance to lethal yellowing in coconut varieties and hybrids in Jamaica *Olagi-neux* 36:9-12
- 2 BERENIKE, E; FLOTT, E.; MOERSBACHER, B M; REIS-ENER, H J 1989 Peroxidase isoenzyme patterns of resistant and susceptible wheat leaves following stem rust infection. *New Phytologist* 111:413-421
- 3 BROWN, A H.D.; ZOHARY, D; NEVO, E 1978 Outcrossing rates and heterozygosity in natural populations of *Hordeum spontaneum* Koch in Israel. *Heredity* 41:49-62
- 4 CARDEÑA, R.; VILLANUEVA, M A ; SANTAMARIA, J M ; OROPEZA, C M 1991 Presence in Yucatan of mycoplasma-like organisms in *Cocos nucifera* palms showing lethal yellowing disease symptoms *Canadian Journal of Plant Pathology* 13:135-138
- 5 EGUIARTE, I. E 1990 Genética de poblaciones de *Astrocaryum mexicanum* Liebm en los Tuxtlas, Veracruz. Tesis Ph.D. Centro de Ecología/UACYP, Universidad Nacional Autónoma de México
- 6 HARRIES, H.C 1974 The Cape Verde region (1499-1549): Key to coconut culture in the Western Hemisphere. *Turrialba* 27:227- 231
- 7 HERNÁNDEZ ROQUE, F 1984. Investigación del germoplasma de palma de coco. In Reunión sobre el Cultivo del Cocotero en el Estado de Colima (I., 1984, Colima, Méx) CONA-FRUT p 48-60
- 8 LAEMMLI, U K. 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 *Nature* (U K) 227:680-685
- 9 MARKWELL, M A ; HAAS, S M ; BIEBER, L L ; TOLBERT, N E 1978 A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples *Analytical Biochemistry* 87:206-210
- 10 O'FARRELL, P A 1975 High resolution two dimensional electrophoresis of proteins *Journal of Biological Chemistry* 250:4007-4021
- 11 RICHARDSON, D L ; HARRIES, H C.; BALSEVICUS, E. 1978. Variedades del cocotero en Costa Rica *Turrialba* 28:87-90
- 12 SHAW, C R ; PRASAD, R 1970 Starch gel electrophoresis of enzymes: A compilation of recipes. *Biochemical Genetics* 4:297-320
- 13 SCANDALIOS, J C 1969 Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: A review. *Biochemical Genetics* 3:37- 79
- 14 SMITH, R W 1970 México. In FAO yearly progress report on coconut breeding FAO, Rome p 20-21.
- 15 VILLANUEVA, M A ; MALEK-HEDAYA I, S 1987 Elimination of endogenous peroxidase artifacts in immunoblots of plant extracts *Plant Science* 52:141-146

16. VALLEJOS, C E. 1983. Isozymes in plant genetics and breeding. S D. Tanksley, T J. Horton (Eds) Amsterdam Elsevier v. A, p 469-516
- 17 WRAY, W.; BOULIKAS, T; WRAY, V.P.; HANCOCK, R. 1981 Silver staining of proteins in polyacrylamide gels Analytical Biochemistry 118:197-203
- 18 WU, F.S; WANG, Y.M. 1984 Extraction of proteins from protease rich-tissues for electrophoresis Analytical Biochemistry 139:100-104.
- 19 ZIZUMBO VILLARREAL, D; ARELLANO MORIN, J. 1989. Establecimiento de una colección de plasma germinal de *Cocos nucifera* L. de México en condiciones de vivero en Temozón Norte, Yucatán: Reporte Técnico. Mérida, Yucatán, Méx., Centro de Investigación Científica de Yucatán; Comisión Nacional de Fruticultura
- 20 ZIZUMBO VILLARREAL, V D; HARRIES, H.C. 1990. El amarillamiento letal del cocotero en México M.L. Robert, D. Zizumbo Villarreal (Eds) Mérida, Yucatán, Méx., Centro de Investigación Científica de Yucatán 197 p

WILSON, W.S. (ED.). 1991. *Advances in Soil Organic Matter Research: The Impact on Agriculture and the Environment*. Cambridge, Inglaterra, The Royal Society of Chemistry. 400 p.

Este volumen presenta el progreso de los estudios sobre materia orgánica en suelos y su aplicabilidad agrícola. Los aspectos básicos y el impacto ambiental, especialmente en condiciones de las zonas templadas, son también considerados.

El material está organizado en cinco secciones, cada una con un comentario introductorio a cargo de un conocido especialista en el campo.

En la primera sección, casi una cuarta parte del volumen, se examina la información reciente sobre la composición química y estructura de la materia orgánica. Se dedica gran atención al estudio de los métodos instrumentales recientes como el de la resonancia magnética nuclear.

En una segunda sección más breve se trata de la relación entre materia orgánica y calidad de agua. Se examinan los problemas ocasionados por los plaguicidas en el agua y, especialmente, el transporte de nitratos.

En la tercera sección se analiza la relación entre materia orgánica en suelos y su estructura, con énfasis especial en la estabilidad de agregados secundarios, tanto en suelos de regiones templadas como en los trópicos. Este, como los otros capítulos, se distinguen por contener un gran volumen de resultados experimentales de campo, citados en apoyo a las presentaciones principales.

En la cuarta sección se informa sobre las transformaciones de la materia orgánica en suelos. Se examinan aspectos novedosos como el efecto de niveles aumentados del CO₂ atmosférico y el uso del C¹⁴ producidos por explosiones nucleares, como indicador de la descomposición de la materia orgánica.

La quinta sección examina el efecto de la materia orgánica sobre la fertilidad de suelos; el efecto de residuos agrícolas como de los urbanos e industriales. Se examina también el papel central desempeñado por la materia orgánica en la agricultura orgánica.

El volumen concluye con un amplio índice de materiales; bien documentado y editado sobre el estado actual de la investigación sobre materia orgánica.

ELEMER BORNEMISZA S.
CENTRO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS
UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

Correlações Fenotípicas entre Caracteres não Destrutíveis e Palmito em Pupunheiras¹

M.L. Alves Bovi*, L.A. Saes**, G. Godoy Junior***

SUMMARY

Vegetative characters and heart of palm yield of peach palm (*Bactris gasipaes* H.B.K.) were studied in a experimental plot grown in São Paulo State, Bra., in an attempt to identify non-destructive traits for estimating yield. Although some characters showed high variability, such as tillering number and softening in the edible portion of the stipe, others revealed less variation, including the foliar raquis length, foliole length and palm height. Positive correlation coefficients were found between some easily measured vegetative characters, such as palm diameter and number of leaves, and the heart of palm yield could be estimated by trunk length, diameter and weight. A smaller number of spines on the trunk was positively correlated with the number of leaves, and also with heart of palm yield. Both traits are proposed for selecting prime palms within the studied population.

Key words: Peach palm, vegetative characters, heart of palm, simple and partial correlations.

RESUMO

Caracteres vegetativos da planta e do palmito de pupunheiras (*Bactris gasipaes* H.B.K.) foram estudados dentro de um lote experimental em cultivo na Estação Experimental de Pariqueraçú, litoral sul do Estado de São Paulo, Bra., com o objetivo de identificar caracteres não destrutíveis que possam, indiretamente, avaliar a produção de palmito dessas palmeiras. Dentre os onze caracteres estudados, o número de perfilhos, o peso bruto do palmito e os pesos do resíduo basal e do palmito mostraram maior variabilidade (CVs acima de 46%). Por outro lado, o comprimento da ráquis foliar, o comprimento do folíolo médio e a altura da planta mostraram-se pouco variáveis (CVs abaixo de 20%). O peso e o diâmetro do palmito apresentaram-se positivamente correlacionados com alguns caracteres não destrutíveis facilmente mensuráveis, tais como o diâmetro da planta (DAP) e o número de folhas. Os coeficientes de correlação linear simples e parciais foram estatisticamente significativos para o caráter ausência de espinhos e número de folhas e, ambos caracteres, apresentaram boa associação com o peso do palmito, indicando ser possível utilizá-los como critério de seleção de plantas elites dentro da população estudada.

Palavras chave: Pupunheira, caracteres vegetativos, palmito, correlações simples e parciais.

INTRODUÇÃO

O palmito, extraído de várias espécies de palmeiras é constituído basicamente da gema apical da planta e das folhas jovens internas, ainda em desenvolvimento, sendo envolto pela bainha das folhas mais velhas que o protege (4). Portanto, palmito é tecido vegetativo que pode ser colhido dos mais diferentes tipos de palmeiras e cujo tamanho, comprimento e peso depende das características próprias da espécie explorada e, dentro dela, das dimensões e número de folhas internas presentes. Num mesmo material genético essas dimensões podem ser afetadas

por uma série de fatores tais com: condições de cultivo, fertilidade do solo, competição, sombreamento, etc.

A exploração do palmito é feita através do corte da palmeira e separação da porção constituída pelas folhas jovens e gema apical (que forma o capitel) da porção do estipe. Em palmeiras que apresentam perfilhamento, como a pupunheira (*Bactris gasipaes* H.B.K.) e o açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.), a colheita do palmito não acarreta em morte da planta, uma vez que os perfilhos se desenvolvem e, dentro de um prazo de tempo, variável de acordo com a espécie em questão, estarão aptos para novos cortes. O mesmo não ocorre com palmeiras de estipe único, como a espécie único, como a espécie *E. edulis* Mart., palmeira tradicionalmente usada para a extração do palmito. Nesta palmeira o corte, para obtenção do produto, acarreta em morte da planta, uma vez que por possuir um único meristema apical a palmeira não se regenera após o abate.

O melhoramento genético visando a produção de palmito é dificultado pelo caráter destrutivo da explora-

¹ Recebido para publicação el 14 de decembro 1989.

* Seção de Plantas Tropicais, Instituto Agronômico (IAC), C P 28, Campinas, SP, Bra

** Estação Experimental de Pariqueraçu, Instituto Agronômico (IAC), Bra.

*** Estação Experimental de Ubatuba, Instituto Agronômico (IAC), Bra.

ção, visto que a seleção de genótipos superiores com base na produção de palmito inviabiliza, pelo menos a curto prazo, o seu uso como progenitor. Torna-se imperativo, portanto identificar caracteres não destrutíveis que estejam altamente associados com o palmito e utilizá-los durante a escolha de palmeiras que devam fazer parte de um programa de cruzamentos controlados.

O presente trabalho visa determinar, dentre vários caracteres vegetativos, aqueles que estejam mais correlacionados com a produção de palmito para a espécie *B. gasipaes*, visando fornecer subsídios para o melhoramento genético dessa palmeira. Esta planta, conhecida como pupunha ou pupunheira, vem sendo alvo de interesse para a exploração racional de palmito no Estado de São Paulo dado a sua precocidade, rusticidade e perfilhamento (1), além da qualidade do produto por ela fornecido (6, 7).

MATERIAL E MÉTODOS

Para este estudo foram feitas medições detalhadas dentro de um lote experimental de pupunheiras existente na Estação Experimental de Pariqueiraçú (24°35'S, 47°50'W), SP.

As sementes que deram origem a essas plantas provieram de Costa Rica, tendo sido enviadas pelo Centro Agronômico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) de Turrialba em 1975. Segundo esse Centro, as sementes foram obtidas através de fecundação aberta de matrizes sem espinhos. O lote experimental, constituído de 384 plantas, foi instalado em 1976 em solo tipo Latossolo Amarelo álico, horizonte A moderado e de textura argilosa (10). Este solo pode ser considerado pobre em nutrientes, apresentando baixo pH (4.3 a 4.5) e alta saturação em alumínio (5.9 a 6.8). O plantio foi feito através de mudas com 14 meses de idade, contando-se desde a semeadura até o estabelecimento do lote. O espaçamento utilizado foi o de 2 x 2 m, estando a área ainda plantada com árvores farinha-seca (*Pithecellobium edwallii* Hochne), no espaçamento de 10 x 10 m, o que propiciou uma sombra leve (em torno de 30% a 40% de sombreamento) à área experimental. Não foram feitas adubações, nem mesmo de plantio e os tratos culturais resumiram-se apenas às roçadas periódicas durante os três primeiros anos.

Embora provenientes de palmeiras sem espinhos no estipe, grande parte das mudas possuíam espinhos em quantidade e tamanho variado, podendo-se separá-las em quatro categorias com relação a esse caráter:

muitos espinhos (grande quantidade e longos), médio (menor quantidade e menor tamanho dos espinhos), poucos (espinhos esparsos) e sem espinhos (completamente inerme). A última categoria constituía cerca de 30% da população.

Sete anos após o plantio foram tomadas, ao acaso, e em condições de competição, 126 plantas, constituídas de 32 sem espinhos (tipo 1) e 94 com muitos espinhos no estipe (tipo 2). Por questões logísticas nem todas as plantas puderam ter todos os caracteres mensurados, sendo que em 34 delas pôde-se fazer avaliações mais detalhadas, enquanto que nas outras 92, medidas básicas relacionadas à planta e ao produto foram obtidas. A seguir é apresentada a descrição dos caracteres avaliados e, entre parênteses, o número de observações tomadas em cada um deles:

1. Diâmetro da planta-mãe a 130 cm de altura do solo (DAP) (n = 120).
 2. Altura da planta, medida do solo até a inserção da folha mais nova (n = 34).
 3. Número de folhas vivas (verdes) (n = 126).
 4. Comprimento da ráquis foliar da sexta folha a partir da folha mais nova e medido do ponto de emissão dos folíolos até a bifurcação deles no ápice (n=34).
 5. Comprimento do folíolo médio da sexta folha (n = 34).
 6. Número de perfilhos (n = 91).
- O corte da porção apical foi executada no local do experimento e os palmitos, após etiquetados, foram levados ao laboratório onde foram realizadas as seguintes medições:
7. Peso do palmito bruto, ou peso do capitel, que constitui a porção apical da palmeira após o corte das ráquis foliares e antes da retirada das bainhas externas que protegem o palmito propriamente dito (n = 50).
 8. Diâmetro do palmito no meio do tolete (diâmetro médio) (n = 104).
 9. Comprimento do palmito, considerado do meristema apical até o término da porção macia ainda envolta por bainha (n = 104).

10. Peso do palmito ($n = 107$).
11. Peso do resíduo basal, que é constituído da porção abaixo do meristema apical até o término da porção macia do estipe (5) ($n = 71$).

Foi feita uma análise preliminar, envolvendo todos os dados, com o objetivo de caracterizar a população no sétimo ano de plantio definitivo. Além da média, calculou-se o desvio padrão, o coeficiente de variação, a amplitude de variação observada para os diferentes caracteres e o intervalo de confiança da média segundo fórmulas descritas por Steel e Torrie (12). Dado a grande variabilidade existente foi estimado o tamanho da amostra ideal, através da qual determina-se qual o número de plantas que deverá ser tomado para que, em situação semelhante, os dados estejam variando em torno de 10% da média para os diversos caracteres estudados. O tamanho da amostra ideal foi calculado segundo a expressão abaixo:

$$AI = [(t \ 0.05 \cdot CV) / 10]^2$$

onde:

- $t_{0.05}$: é o valor de t obtido na tabela de Student ao nível de 5% de probabilidade e com $n-1$ graus de liberdade;
- Cv : é o coeficiente de variação calculado pela divisão do desvio padrão pela média e expresso em porcentagem.

Após a análise preliminar foram feitas análises de correlações lineares simples entre os caracteres da planta (1 a 6) e os do palmito (7 a 12) pelo método de Pearson (12). Dado a presença de correlações significativas, principalmente, entre caracteres não destrutíveis, foram estudadas as correlações parciais, através das quais torna-se possível medir a associação entre duas variáveis eliminando possíveis efeitos de outras. Para as correlações simples e parciais foi considerado o nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As principais estimativas descritivas dos caracteres avaliados encontram-se no Quadro 1. Os resultados

mostram que a população estudada possuía, após sete anos de campo, uma altura média de 6.64 m, diâmetro da planta-mãe ao redor de 15 cm, com cerca de 13 folhas funcionais, cada qual possuindo, em média, um comprimento de 326 cm e com comprimento de folíolo ao redor de 76 cm. A média de perfilhos na população estudada esteve ao redor de cinco por planta. A produção média de palmito e resíduo basal foi de 719 e 612 gramas respectivamente, com 46 cm de comprimento médio de palmito por 5.6 cm de diâmetro medido no meio do tolete. O peso bruto do palmito, que corresponde ao peso do palmito não descascado, ou peso do capitel sem as bainhas foliares, foi, em média, de 15.7 quilos. Portanto, a porção aproveitada da palmeira para fins comestíveis (palmito e resíduo basal) correspondeu apenas à cerca de 8% do peso bruto e menos de 6% da altura total da palmeira.

Pela amplitude dos dados obtidos nota-se grande variabilidade para a maioria dos caracteres avaliados. Dentre as estimativas apresentadas, o coeficiente de variação é a que permite comparação da variabilidade entre os caracteres expressos em unidades diferentes. Observando-se os valores dessa estimativa nota-se que os caracteres peso bruto, peso do palmito, peso do resíduo basal e número de perfilhos apresentaram maior variabilidade, com coeficientes de variação acima de 46%. Para essas variáveis o tamanho da amostra ideal esteve sempre acima da amostra realmente tomada. A estimativa da amostra ideal foi determinada considerando qual o tamanho que esta amostra deveria ter para que a média populacional fosse estimada com um desvio de 10%.

Para número de perfilhos o tamanho ideal seria 117 plantas, enquanto que para o peso bruto do palmito e do resíduo basal estaria acima de 108 e 86 unidades, respectivamente. O peso do palmito, caráter de maior importância dentre os estudados, uma vez que expressa o rendimento ou a produtividade da planta, também apresentou grande variabilidade e a amostra ideal estaria acima de 138 unidades. Por outro lado, os caracteres não destrutíveis com menor variabilidade (coeficiente de variação abaixo de 20%) foram: altura da planta, comprimento do folíolo médio e comprimento da ráquis foliar. Para esses caracteres de baixa variabilidade, apenas de 3 a 15 plantas são suficientes para constituírem uma amostra ideal.

As estimativas dos coeficientes de correlação linear simples entre todas as combinações de caracteres vegetativos não destrutíveis e caracteres do palmito

Quadro 1. Número de observações e estimativas da média, desvio padrão, coeficiente e amplitude de variação, intervalo de confiança e tamanho da amostra ideal de onze caracteres de pupunheiras cultivadas na Estação Experimental de Pariqueiraçu, IAC, SP.

| Caracteres | Número de observações | Média | Desvio padrão | Coefficiente de variação | Amplitude de variação | Intervalo (1) de confiança | Amostra (2) Ideal |
|--------------------------------|-----------------------|--------|---------------|--------------------------|-----------------------|----------------------------|-------------------|
| Diâmetro (cm) | 120 | 15.11 | 3.28 | 21.74 | 20.00 | 0.60 | 18.72 |
| Altura (cm) | 34 | 664.50 | 123.48 | 18.58 | 593.00 | 42.99 | 14.23 |
| Número de folhas | 126 | 12.89 | 4.08 | 31.64 | 24.00 | 0.71 | 38.45 |
| Comprimento ráquis foliar (cm) | 34 | 325.59 | 27.07 | 8.31 | 141.00 | 9.43 | 2.85 |
| Comprimento folíolo médio (cm) | 34 | 75.82 | 9.12 | 12.03 | 46.00 | 3.18 | 5.97 |
| Número de perfilhos | 91 | 4.78 | 2.60 | 54.44 | 16.00 | 0.54 | 117.39 |
| Peso bruto do palmito (kg) | 50 | 15.67 | 8.12 | 51.82 | 30.00 | 2.31 | 108.50 |
| Peso do resíduo basal (g) | 71 | 612.55 | 286.97 | 46.85 | 1.144.00 | 67.77 | 86.92 |
| Peso do palmito (g) | 107 | 719.30 | 425.21 | 59.11 | 1.813.00 | 81.80 | 138.39 |
| Diâmetro médio do palmito (cm) | 104 | 5.63 | 1.51 | 26.87 | 7.30 | 0.30 | 28.60 |
| Comprimento do palmito (cm) | 104 | 46.01 | 11.77 | 25.59 | 49.00 | 2.30 | 108.50 |

* Intervalo de confiança com $p=0.05$ ** Amostra ideal $[(ct\ 0.05 \cdot cv)/10]^2$

(destrutíveis) avaliados estão contidas no Quadro 2. Há uma forte associação entre o diâmetro da planta, o número de folhas funcionais, a altura da planta e o comprimento da ráquis foliar com a produção de palmito. O diâmetro da planta-mãe, o número de folhas vivas e o comprimento da ráquis foliar estão também intimamente associados ao diâmetro médio e ao comprimento do palmito. Por sua vez, a altura da planta mostrou boa associação fenotípica com o peso e o diâmetro do palmito, porém não com o seu comprimento. Clement e colaboradores (3) encontraram também coeficiente de correlação significativa entre o diâmetro do estipe e o peso do palmito.

As estimativas dos coeficientes de correlação linear simples foram, evidentemente, altamente significativas para peso, diâmetro e comprimento do

palmito, uma vez que diâmetro e comprimento são componentes do peso.

O resíduo basal mostrou associação significativa positiva como o diâmetro da planta e também com o peso, diâmetro e comprimento do palmito. Apresentou, porém, associação negativa com o número de perfilhos e com a presença de espinhos.

O peso do palmito bruto mostrou coeficientes de correlação positivos e significativos com diâmetro da planta, número de folhas, número de perfilhos e ainda com o peso, diâmetro e comprimento do palmito.

O diâmetro da planta-mãe mostrou-se negativamente associado com o número de perfilhos, evidenciando uma relação lógica de competição dentro da

Quadro 2. Estimativas dos coeficientes de correlação linear simples, nível de significância e números de pares de observações (entre parênteses) de doze caracteres de pupunheira cultivados na Estação Experimental de Paríqueraçu, IAC, SP.

| Caracteres | ALT | NFO | CRF | CFM | NPE | ESP* |
|------------------------------------|-----------------|------------------|-------------------|-------------------|------------------|------------------|
| Diâmetro (DAP) | 0.0046 (34) | 0.5607* (120) | 0.1234 (34) | 0.1465 (34) | -0.2408* (91) | 0.1338* (120) |
| Altura (ALT) | | 0.5809* (34) | 0.1359 (34) | 0.2836 (34) | 0.1580 (34) | 0.2729 (34) |
| Número de folhas (NFO) | | | 0.0133 (34) | 0.2806 (34) | 0.1084 (91) | -0.0025 (125) |
| Comprimento da raquis foliar (CRF) | | | | 0.3560* (34) | -0.1280 (34) | -0.2669 (34) |
| Comprimento do folíolo médio (CFM) | | | | | 0.0697 (34) | -0.0306 (34) |
| Número de perfilhos (NPE) | | | | | | 0.2425* (91) |
| Espinhos no estipe (ESP) | | | | | | |
| Peso bruto do palmito (PBP) | | | | | | |
| Peso de resíduo basal (PRB) | | | | | | |
| Peso do palmito (PPA) | | | | | | |
| Diâmetro médio do palmito (DPA) | | | | | | |
| Comprimento do palmito (CPA) | | | | | | |
| | PBP | PRB | PPA | DPA | CPA | |
| Diâmetro (DAP) | 0.7090* (50) | 0.4492* (71) | 0.6244* (101) | 0.3112* (98) | 0.3909* (98) | |
| Altura (ALT) | | -0.0427 (24) | 0.4725* (24) | 0.4617* (24) | 0.3003 (24) | |
| Número de folhas (NFO) | 0.8013* (50) | 0.2035 (71) | 0.6322* (107) | 0.3762* (104) | 0.5152* (104) | |
| Comprimento da raquis foliar (CRF) | | 0.1662 (24) | 0.5222* (24) | 0.4356* (24) | 0.4495* (24) | |
| Comprimento do folíolo médio (CFM) | | 0.0360 (24) | 0.2746 (24) | 0.2431 (24) | 0.3617 (24) | |
| Número de perfilhos (NPE) | 0.3553* (50) | -0.2776* (71) | -0.1397 (72) | -0.2197 (69) | -0.0816 (69) | |
| Espinhos no estipe (ESP) | 0.1007 (50) | -0.4287* (71) | -0.1919* (107) | -0.4536* (104) | -0.0884 (104) | |
| Peso bruto do palmito (PBP) | | 0.0890 (44) | 0.7120* (45) | 0.7208* (43) | 0.4166* (43) | |
| Peso de resíduo basal (PRB) | | | 0.5677* (71) | 0.6433* (68) | 0.3903* (68) | |
| Peso do palmito (PPA) | | | | 0.6232* (104) | 0.8139* (104) | |
| Diâmetro médio do palmito (DPA) | | | | | 0.4351* (104) | |
| Comprimento do palmito (CPA) | | | | | | |

(1) Ausência de espinhos no estipe = 1; Presença de espinhos no estipe = 2

* Significativo a 5% de probabilidade.

touceira: plantas mais perfilhadas possuem menor desenvolvimento da planta-mãe, uma vez que estes, provavelmente, concorrem com a distribuição de assimilados dentro da touceira.

Outra relação interessante encontrada foi a correlação entre o caráter ausência (tipo 1) e presença (tipo 2) de espinhos no estipe com o resíduo basal e palmito (peso e diâmetro). Plantas sem espinhos tiveram sempre maiores pesos, tanto de resíduo basal como de palmito, além de maior diâmetro deste último. Por outro lado, a presença de espinhos esteve positivamente correlacionada com o número de perfilhos da planta. O caráter ausência de espinhos é de real importância para o melhoramento genético da pupunheira, visto que simplifica sobremaneira os tratamentos culturais e o processamento do produto.

Segundo Hunter (8), a falta de aceitabilidade da pupunheira como cultivo deve-se, principalmente, à presença de espinhos na planta. Embora Mora Urpi e Clement (9) tenham sugerido que espinhos no estipe e no pecíolo/ráquis da pupunheira são de origem mendeliana simples e terem encontrado correlações positivas

entre os dois caracteres (3) em populações da Amazônia, esses mesmos autores nada comentam sobre possíveis correlações entre ausência e presença de espinhos e outros caracteres da planta e produção de palmito. No entanto, na população aqui estudada esse caráter mostrou-se positivamente associado àqueles diretamente relacionados com a produção (resíduo basal, peso e diâmetro do palmito), indicando que uma seleção para ausência de espinhos, possivelmente, resultaria em plantas com boa produção de palmito e resíduo basal.

Visto que os mais significativos caracteres não destrutíveis do ponto de vista de palmito, estão associados entre si, torna-se necessário considerar as correlações parciais através das quais é possível obter coeficiente de correlação entre duas variáveis eliminando possíveis efeitos das outras. Obtêm-se então a estimativa da correlação a ser esperada entre duas variáveis se ambas forem observadas em relação a outras consideradas como fixas. Os efeitos das outras variáveis sobre aquelas de interesse são controlados pela remoção da associação linear entre elas antes de calcular os coeficientes de correlação entre as duas variáveis de inte-

Quadro 3. Estimativas dos coeficientes de correlação parcial, nível de significância e número de observações (entre parênteses) de sete caracteres vegetativos e do peso do palmito de pupunheiras cultivadas na Estação Experimental de Pariqueiraçu, IAC, SP.

| Caracteres | ALT | NFO | CRF | CFM | NPE | ESP(1) | PPA |
|------------------------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|-------------------|-------------------|
| Diâmetro (DAP) | -0.6368* (34) | 0.4667 (120) | -0.1852 (34) | 0.1098 (34) | -0.2761* (91) | 0.2586* (120) | 0.5605* (101) |
| Altura (ALT) | | 0.5314* (34) | -0.0598 (34) | 0.1478 (34) | -0.1090 (34) | 0.4526* (34) | 0.4626 (24) |
| Número de folhas (NFO) | | | -0.3619 (34) | 0.1579 (34) | 0.2828* (91) | -0.2325* (126) | 0.2003* (107) |
| Comprimento da ráquis foliar (CRF) | | | | 0.3778* (34) | 0.1006 (34) | -0.1253 (34) | 0.6070* (24) |
| Comprimento do folíolo médio (CFM) | | | | | 0.0668 (34) | -0.0227 (34) | -0.1892 (24) |
| Número de perfilhos (NPE) | | | | | | 0.2096 (91) | 0.0326 (72) |
| Espinhos no estipe (ESP) | | | | | | | -0.2222* (107) |
| Peso do palmito (PPA) | | | | | | | |

(1) Ausência de espinhos no estipe = 1; Presença de espinhos no estipe = 2
* Significativo a 5% de probabilidade

Quadro 4. Estimativas dos coeficientes de correlação parcial, nível de significância e número de observações (entre parênteses) de sete caracteres vegetativos e do peso do resíduo basal de pupunheiras cultivadas na Estação Experimental de Pariqueraçu, IAC, SP.

| Caracteres | ALT | NFO | CRF | CFM | NPE | ESP(1) | PRB |
|------------------------------------|------------------|------------------|-----------------|----------------|------------------|-------------------|------------------|
| Diâmetro (DAP) | -0.5224* (34) | 0.7069* (120) | 0.2249 (34) | 0.0213 (34) | -0.2998* (91) | 0.2799* (120) | 0.3488* (71) |
| Altura (ALT) | | 0.7208* (34) | 0.3127 (34) | 0.0748 (34) | -0.1265 (34) | 0.4193* (34) | 0.1277 (24) |
| Número do folhas (NFO) | | | -0.3086 (34) | 0.1201 (34) | 0.2724* (91) | -0.2984* (126) | 0.0829 (71) |
| Comprimento da ráquis foliar (CRF) | | | | 0.3361 (34) | -0.0126 (34) | -0.3136 (34) | -0.0119 (24) |
| Comprimento do folíolo médio (CFM) | | | | | 0.0695 (34) | -0.0005 (34) | -0.0487 (24) |
| Número de perfilhos (NPE) | | | | | | 0.1677 (91) | -0.0922 (71) |
| Espinhos no estipe (ESP) | | | | | | | -0.3920* (71) |
| Peso do resíduo basal (PRB) | | | | | | | |

(1) Ausência de espinhos no estipe = 1; Presença de espinhos no estipe = 2

* Significativo a 5% de probabilidade

resse. Correlações parciais são úteis para esclarecer relações que não são detectadas em razão do efeito conjunto das variáveis, identificando aquelas que interferem na associação de pares de interesse e detectando correlações simples não válidas, isto é; quando outros fatores não são considerados.

Análises de correlação parcial foram feitas entre os caracteres vegetativos e cada um dos caracteres destrutivos. Dado a semelhança dos coeficientes de correlação parcial obtidos são apresentadas apenas as correlações entre os caracteres vegetativos e os caracteres destrutivos de maior importância agrônômica, ou seja: peso do palmito e do resíduo basal.

Nos quadros 3 e 4 encontram-se os coeficientes de correlações parciais envolvendo as variáveis de interesse, bem com o número de observações por pares e a significância. Correlação parcial não envolve a noção de variáveis dependentes e independentes, podendo ser vista como uma medida de interdependência (11). Relações interessantes anteriormente não identificadas entre diâmetro e altura e diâmetro e espinhos pôde ser visualizada através deste procedimento. Os resultados mostram uma interdependência negativa entre altura e diâmetro e positiva entre diâmetro e presença de espinhos.

A correlação parcial obtida entre diâmetro da planta e peso do palmito (Quadro 3) evidencia a alta associação existente entre ambos caracteres, ratificando os resultados anteriormente obtidos através das correlações simples. O mesmo pode ser dito do número de folhas e do comprimento da ráquis foliar com relação a esse carácter destrutível.

A altura da planta mostrou forte associação positiva com o número de folhas e com a presença de espinhos, porém não apresentou correlação estatisticamente significativa com os principais fatores de produção: peso do palmito e do resíduo basal.

A associação do número de folhas vivas e peso do palmito apresentou coeficiente de correlação parcial estatisticamente significativo a 5% de probabilidade, ratificando também os resultados obtidos na análise de correlações simples. O número de folhas mostrou ainda associação fenotípica positiva com o número de perfilhos e negativa com a presença de espinhos.

O comprimento da ráquis foliar mostrou-se positivamente correlacionado com o comprimento do folíolo médio e com o peso do palmito. Por outro lado, o comprimento do folíolo médio da sexta folha não apresentou associação estatisticamente significativa com

nenhum outro carácter estudado, além do anteriormente citado.

Do ponto de vista prático, pode-se concluir que diâmetro, número de folhas e comprimento da ráquis foliar estão direta e positivamente associados à produção de palmito. O número de folhas vivas e o comprimento da ráquis da sexta folha, conjuntamente com o diâmetro da planta servem de base, em situação de homogeneidade ambiental, para a seleção de plantas superiores de interesse agrônomico. No entanto, não se deve esquecer do mascaramento de associações causadas por outras variáveis correlacionadas entre si. Desta forma, ausência de espinhos parece estar, pela análise inicial, negativamente correlacionada com o número de perfilhos; no entanto, fixados todos os outros caracteres, essa variável mostrou associação positiva apenas com o peso do palmito e o número de folhas, e negativa com o diâmetro e com a altura da planta. Com os demais caracteres de interesse não houve correlações parciais significativas, ou a amostra tomada não foi grande o suficiente para detectar a correlação, se ela estava presente.

Os resultados aqui obtidos mostram ainda que plantas sem espinhos produzem mais palmito em relação às com espinho devido, principalmente, a possuírem maior número de folhas, embora apresentem, em média, menores diâmetros da planta e altura. Seleção para ausência de espinhos nesta população provavelmente resultaria em plantas com boa produção de palmito e resíduo basal e com maior número de folhas. Clement *et al.* (3), comentando resultados anteriormente obtidos, observou que quanto maior o número de folhas vivas maior é o número de folhas imaturas, internas, ou seja: maior o palmito, uma vez que este é constituído exatamente dessas folhas jovens, internas, ainda em desenvolvimento (4). Foi detectada uma relação aproximada de 2:1 entre o número de folhas expandidas e o número de folhas internas da pupunheira (3).

A variabilidade fenotípica (CV acima de 30%) encontrada neste material para o número de folhas, conjuntamente com a sua correlação positiva com o peso do palmito e com a ausência de espinhos, torna possível recomendar o uso deste carácter (número de folhas funcionais) como um critério de seleção de plantas superiores, sem espinhos, dentro da população estudada.

CONCLUSOES

- Os caracteres número de perfilhos, peso bruto e peso do resíduo basal e do palmito mostraram grande variabilidade na amostra de pupunheiras avaliadas, com coeficientes de variação acima de 46%.
- Os caracteres de menor variabilidade foram comprimento da ráquis foliar, comprimento do folíolo médio e altura, com coeficientes de variação abaixo de 20%.
- Os caracteres destrutíveis que avaliam produção mostraram-se positivamente correlacionados com alguns caracteres não destrutíveis facilmente mensuráveis, tais como diâmetro e número de folhas, podendo-se utilizá-los para a seleção de pupunheiras com alta produção de palmito.
- Embora através das correlações lineares simples tenha sido obtida associação entre ausência ou presença de espinhos e número de perfilhos, não se obtiveram, através de correlações parciais, coeficientes significativos para esses caracteres, indicando que a possível relação positiva entre número de perfilhos e presença de espinhos tenha sido obtida por interferência de outras variáveis correlacionadas.
- A ausência de espinhos no estipe mostrou-se positivamente correlacionada com o número de folhas e, ambos os caracteres, apresentaram boa associação com o peso do palmito.
- O carácter ausência de espinhos no estipe apresentou-se também positivamente correlacionado com o peso do resíduo basal.

LITERATURA CITADA

1. BOVI, M.L.A.; GODOY JUNIOR, G.; SAES, L.A. 1987 Pesquisas com os gêneros *Euterpe* e *Bactris* no Instituto Agrônomico de Campinas. *O Agrônomico* 39(2):129-174
2. CLEMENT, C.R.; MORA URPI, J. 1985 Phenotypic variation of peach palm observed in the Amazon basin. In Final report: Peach palm (*Bactris gasipaes* H.B.K.) germ plasm bank. C.R. Clement, L. Coradin (Eds). San José, C.R., USAID Project Report p 92-106

3. CLEMENT, C.R.; CHAVES, F.W.B.; GOMES, J.B.M. 1987. Considerações sobre a pupunha (*Bactris gasipaes* HBK.) como produtora de palmito. In Palmito: Encontro Nacional de Pesquisadores (1., 1987, Curitiba) Anais p. 225-247
4. FERREIRA, V.L.P.; MIYA, E.E.; SHIROSE, I.; ARANHA, C.; SILVA, E.E.A.M.; HIGHLANDS, M.E. 1976. Comparação físico-químico-sensorial do palmito de três espécies de palmeira. Coletânea do ITAL. 7(2):389-416
5. FERREIRA, V.L.P.; YOKOMIZO, Y. 1978. O aproveitamento da porção macia do estipe da palmeira juçara na alimentação humana. Coletânea do ITAL. 9:27-41.
6. FERREIRA, V.L.P.; GRANER, M.; BOVI, M.L.A.; DRAETTA, I.S.; PASCHOALINO, J.E. & SHIROSE, I. 1982. Comparação entre os palmitos de *Guilielma gasipaes* Bailey (pupunha) e *Euterpe edulis* Mart. (juçara). I. Avaliações físicas, organolépticas e bioquímicas. Coletânea do ITAL. 12:255-272
7. FERREIRA, V.L.P.; GRANER, M.; BOVI, M.L.A.; FIGUEIREDO, I.B.; ANGELUCCI, E.; YOKOMIZO, Y. 1982. Comparação entre os palmitos das palmeiras *Guilielma gasipaes* Bailey (pupunha) e *Euterpe edulis* Mart. (juçara). II. Avaliações físicas e químicas. Coletânea do ITAL. 12:273-282
8. HUNTER, J.R. 1969. The lack of acceptance of the pejobaye palm and a relative comparison of its productivity to that of maize. Economic Botany 23(3):237-244
9. MORA URPI, J.; CLEMENT, C.R. 1985. Races and populations of peach palm found in the Amazon basin. In Final report: Peach palm (*Bactris gasipaes* HBK.) germ plasm bank. C.R. Clement, I. Coradin (Eds.) San José, C.R., USAID Project Report p. 107-141
10. SAKAI, E.; LEPSCH, L.F. 1984. Levantamento pedológico detalhado da Estação Experimental de Pariqueira-Açu. Campinas, Instituto Agronômico. Boletim Técnico no 83. 56 p.
11. SNEDECOR, G.W.; COCHRAN, W.G. 1974. Statistical methods. Ames, Iowa State University Press. 593 p.
12. STEEL, R.G.; TORRIE, J.H. 1980. Principles and procedures of Statistics. New York, McGraw-Hill. 632 p.

WESTERMAN, R.L. (ED.). 1992. Soil Testing and Plant Analysis. 3a. ed. Madison, WI, USA, Soil Soc. Amer. 812 p.

Esta publicación constituye posiblemente el libro de referencia más importante sobre pruebas de suelos y análisis de plantas. Con base en la amplia experiencia en dos ediciones previas, se trata en forma equilibrada tanto los principios como las prácticas modernas de análisis de estos materiales. Los cincuenta y tres autores han reunido lo mejor en la bibliografía, incluso una cantidad apreciable de trabajos sobre los trópicos, referente a los enfoques más actualizados sobre análisis de suelos y plantas y su interpretación adecuada. En adición a los siete capítulos donde se examinan métodos de análisis de suelo para los diferentes elementos, se introducen otros muy novedosos como sobre el análisis de medios artificiales para producción de plantas y sobre el análisis de metales tóxicos como Pb, Cal y otros.

Se discute también en otros dos capítulos los aspectos generales del análisis foliar y en diez adicionales la aplicación de esta técnica a cultivos anuales y perennes. Se consideran tanto las experiencias en las zonas

templadas como, en cierto grado, las provenientes de los trópicos.

El volumen concluye con dos capítulos generales, uno sobre instrumentos usados para análisis de suelos y plantas y su aprovechamiento moderno en laboratorios guiados por computadora. Otro fue dedicado al procesamiento de datos que resultan del análisis foliar y de suelos. Un buen índice de materias facilita la búsqueda de tópicos.

Este volumen es una referencia obligatoria, especialmente para todas las bibliotecas de ciencias agrícolas, forestales y de estudios del ambiente. Por su moderno precio y gran utilidad se recomienda a quienes tengan interés en análisis agrícolas y ambientales. No se requieren conocimientos muy avanzados de química para su manejo y el lenguaje en inglés es claro y sencillo.

ELEMER BORNEMISZA S.
FACULTAD DE AGRONOMÍA
UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

Reproducción Sexual y Partenogenética de *Cephalonomia stephanoderis* Betrem en Laboratorio

F. Infante*, J.F. Barrera*, J. Gómez*,
A. Castillo, W. de la Rosa*

ABSTRACT

The fecundity of the parasitoid *Cephalonomia stephanoderis* was compared for females which were not fertilized (NF), fertilized by males within (FI), or outside of coffee berries (FE). In addition, survival and fecundity tables were established and population parameters of this species were estimated, in order to evaluate several biological characteristics. The preoviposition period was shorter in fertilized than non-fertilized females (average for FE = 4.8 d, for FI = 3.6 d versus NF = 7.0 d). The oviposition capacity was greater for fertilized females than for non-fertilized females (FE = 1.27 and FI = 1.32 eggs/female/day, versus NF = 0.75 eggs/female/day). Fertilized females produced progeny of both sexes; non-fertilized females produced only male progeny. An FI individual was the most fecund individual of the three groups, producing 139 eggs in 66 days, but the average total production per female was 66.3, 51.4, and 28.2 eggs for the groups FI, FE, and NF, respectively. Females fertilized naturally within the coffee fruits showed population growth rates similar to those fertilized outside the fruits. The most important estimated parameters calculated were: for FE, $r_m = 0.1012$, $r_0 = 45$, $G = 37.61$, and $\lambda = 1.10$; for FI, $r_m = 0.1067$, $r_0 = 58.04$, $G = 38.06$ and $\lambda = 1.11$. These parameters could not be estimated for NF, since no females are produced through asexual reproduction. Under optimal laboratory conditions, the parasitoid exhibited good population growth, an indication that it possessed desirable traits for biological control of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*.

INTRODUCCION

Cephalonomia stephanoderis (Hymenoptera: Bethyridae) es un ectoparasitoide originario de Africa Occidental que, en 1988, fue introducido a Tapachula, Chiapas, Méx. (6), para combatir biológicamente a la broca del café, *Hypothenemus*

COMPENDIO

Se comparó la fecundidad del parasitoide *Cephalonomia stephanoderis* en hembras no fertilizadas (NF) y fertilizadas por machos, dentro (FI) y fuera (FE) de los frutos de café. Asimismo, con la elaboración de tablas de supervivencia y fecundidad, se estimaron los parámetros poblacionales de esta especie para evaluar algunas características biológicas. El tiempo de preovipostura fue más corto en hembras fertilizadas (en promedio FE = 4.8 d y FI = 3.6 d), mientras que en NF fue de siete días. Se determinó que la capacidad de ovipostura fue mayor en hembras fertilizadas (FE = 1.27 y FI = 1.32 huevos por hembra por día) y con el resultado de una progenie de ambos sexos; cuando las hembras no son fertilizadas (NF = 0.75 huevos/hembra/día) se producen únicamente machos. El espécimen que más ovipositó fue del grupo FI (139 individuos en 66 d de vida), pero el promedio por hembra fue de 66.3, 51.4 d huevos 28.2 para los grupos FI, FE y NF, respectivamente. Las hembras fertilizadas naturalmente dentro de frutos de café tuvieron tasas de crecimiento poblacional similares a las fertilizadas fuera de los frutos. Entre los parámetros estimados más importantes, se calculó $r_m = 0.1012$, $r_0 = 45$, $G = 37.61$ y $\lambda = 1.10$ en hembras FE; $r_m = 0.1067$, $r_0 = 58.04$, $G = 38.06$ y $\lambda = 1.11$ para hembras FI. En el grupo NF estos parámetros no pudieron ser estimados, porque no se procrean hembras cuando la reproducción es asexual. Los resultados muestran que en laboratorio y en condiciones óptimas el parasitoide tiene un buen crecimiento poblacional; eso indica que posee atributos deseables para el control biológico de la broca del café (*Hypothenemus hampei*).

hampei (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae), principal insecto-plaga del café en el Sureste de México.

Después de estudiar esa plaga en México durante de varios años (1, 2, 3, 4), se investigaron diversas estrategias para controlar el *H. hampei*, entre ellas un proyecto de control biológico clásico que utiliza enemigos naturales exóticos de la plaga traídos de Africa; así se introdujo el *C. stephanoderis*.

Dentro de cualquier programa de biocontrol, es necesario evaluar las características biológicas de los entomófagos en cuestión. Doutt y DeBach (10) mencionan algunos atributos que debe tener un enemigo natural efectivo, sea éste un parasitoide o depredador, entre los que destaca una fecundidad alta.

1 Recibido para publicación el 20 de agosto de 1991.

Se agradece el apoyo brindado por Joel Herrera; por la revisión del manuscrito a Pablo Liedo y por sus sugerencias y comentarios importantes a Héctor Esquinca, y por la ayuda desde el inicio del Programa a la Unión Regional de Productores de Café Tacaná (URPCT). Esta investigación se desarrolló gracias al apoyo económico otorgado por el *International Developmental Research Centre* (IDRC) de Canada.

* Centro de Investigaciones Ecológicas del Sureste, Departamento de Control Integrado de Plagas Apartado Postal 36 30700 Tapachula, Chiapas, Méx.

El hábitat natural de *C. stephanoderis* es el interior de los frutos de café, en donde se encuentra parasitando el *H. hampei*; generalmente, en ese mismo lugar, las hembras del parasitoide son fertilizadas por machos, sin embargo, esta especie también tiene la facultad de reproducirse partenogenéticamente (12) cuando los machos son escasos.

Con el fin de determinar si existían diferencias en cuanto a la capacidad reproductiva de *C. stephanoderis*, cuando las hembras eran fertilizadas por machos (dentro y fuera de frutos de café) y cuando se reproducían partenogenéticamente, se estimaron algunos de sus parámetros poblacionales en laboratorio, elaborando tablas de supervivencia y fecundidad para tal fin; mediante esa técnica gran número de investigadores como Messenger (14), Smith y Pimentel (19), Chabora (8), Pak y Oatman (15), Hawkins y Smith (11) han estudiado importantes características biológicas de algunas especies de parasitoides y depredadores.

MATERIALES Y METODOS

Se realizó un experimento en laboratorio con tres grupos de individuos. El primero se integró con hembras NF; los especímenes fueron separados individualmente desde que se encontraban en estado pupal (capullo), para tener la certeza de que esas hembras eran vírgenes. El segundo se formó con hembras FI, seleccionadas entre los individuos que emergían diariamente de frutos, en recipientes donde se cría el parasitoide en laboratorio, pues de acuerdo con Koch (12) son hembras que antes de salir de los frutos se aparean con sus hermanos, por lo que emergen ya fertilizadas. El tercer grupo, lo constituyeron hembras FE; es decir, vírgenes que fueron separadas desde el estado pupal y colocadas en forma individual con varios machos en tubos de vidrio para propiciar la cópula, garantizando, de esta manera, la fertilización de cada hembra.

Por cuestiones metodológicas el número de individuos para cada grupo fue diferente, sobre todo en el último caso, en el que fue difícil determinar el sexo de los machos sin causarles daño. Quedaron constituidos tres grupos: 15 NF, 18 FI y 7 FE, y una vez conformados se indujo a las hembras a ovipositar sobre hospederos expuestos (fuera de frutos de café); para ello se utilizó la metodología de cría propuesta por Koch (12), a la que

se denominó *in vitro*, posteriormente habilitada por Barrera *et al.* (6).

Esa metodología consiste en lo siguiente:

En tubos de vidrio tapados con malla fina (2 cm de diámetro por 6 cm de longitud), se pusieron hembras del parasitoide, de los grupos mencionados, con diferentes estados biológicos de su hospedero *H. hampei*: huevos y larvas pequeñas para su alimentación y prepupas y pupas para su parasitación. Posteriormente, utilizando un microscopio estereoscópico, se realizaron observaciones diarias para detectar los hospederos parasitados, los cuales fueron separados en tubos de vidrio similares a los ya descritos.

Todos los días, cada hembra fue dotada de hospederos suficientes para proporcionarle alimento y una fuente constante de parasitación. Además se registró el día de su emergencia del capullo, el día en que empezó a ovipositar, la producción diaria de huevos y la edad a su muerte. El experimento se mantuvo en condiciones ambientales controladas, con temperatura de 26.18°C ± 1.14°C y humedad relativa de 77.71% ± 7.19%; el fotoperíodo fue de 12:12 (L:O) horas.

El número de huevos puestos diariamente fue contado y dividido entre el número de hembras sobrevivientes ese día (16), la sumatoria de estos datos ($\sum Mx$) proporcionó la tasa de reproducción global (TRG) y la media general; el número de oviposiciones diarias en promedio por hembra (ODPH). La fecundidad (m_x) fue estimada sobre una proporción de siete hembras por cada macho de acuerdo con Barrera *et al.* (7).

La capacidad innata de incremento poblacional (r_m) fue calculada con el método de Birch (20); la ecuación se solucionó mediante sustitución por ensayo y error en donde:

$$\sum l_x m_x e^{-r_x} = 1$$

Los demás parámetros poblacionales fueron estimados según Messenger (14), Southwood (20), Rabinovich (17) y Krebs (13), según las siguientes fórmulas: tasa neta de reproducción (r_0) = $l_x m_x$; tiempo generacional (G) = $\log_e r_0 / r_m$; tasa finita de multiplicación (λ) = $\text{anti-log}_e r_m$ y tiempo de duplicación (λ^2) = $2 \log_e / r_m$.

RESULTADOS Y DISCUSION

Supervivencia y longevidad

Se compararon las curvas de supervivencia (lx) para hembras de *C. stephanoderis* de NF, FE y FI. Como se observa, los tres grupos exhibieron curvas de supervivencia parecidas entre sí, similares a las que Rabinovich (17) definió como curvas tipo II, las cuales representan un sistema donde hay un número constante de organismos que mueren por unidad de tiempo, independientemente del número de los que sobreviven. Las edades en que los tres grupos alcanzaron el 50% de supervivencia difirieron entre sí: NF, 19 d; FE, 35 d, y FI, 46 d, después de emergido el adulto. Como se observa, las hembras vírgenes tuvieron una supervivencia del 50% menor que en los dos grupos restantes; sin embargo, su longevidad fue mayor (NF = 81 d; FE = 67 d y FI = 73 d).

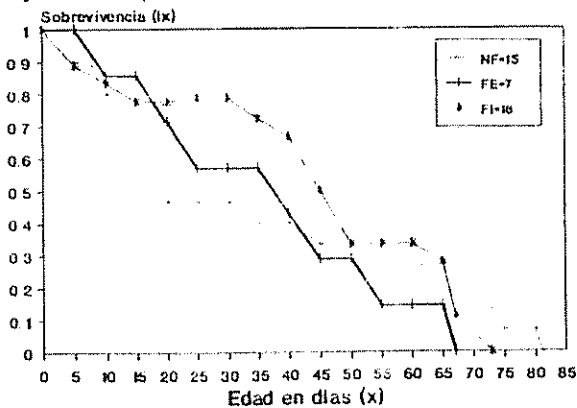


Fig. 1. Curvas de supervivencia (lx) para tres grupos de hembras de *C. stephanoderis* en laboratorio: hembras no fertilizadas (NF), hembras fertilizadas dentro (FI) y fuera (FE) de frutos de café. El día cero es cuando emergieron como adultos

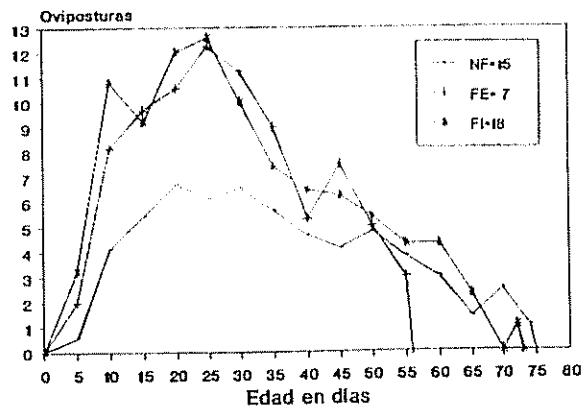


Fig. 2. Promedio de ovipositoras por individuo (rango de cinco días) de tres grupos de hembras de *C. stephanoderis*. Hembras no fertilizadas (NF), hembras fertilizadas dentro (FI) y fuera (FE) de frutos de café. El día cero indica la emergencia de las hembras como adultos.

Considerando que las hembras NF fueron, también, las que menos número de huevos pusieron (Fig. 2), pero más longevas, posiblemente porque la energía no empleada en la ovipostura les proporcionó mayor tiempo de vida.

Producción de huevos

Las hembras NF fueron capaces de reproducirse partenogénicamente, dando lugar sólo a machos (arrenotokia), lo que concuerda con Koch (12); al contrario, la descendencia de las hembras fertilizadas fue bisexual. El período promedio de preoviposición para las hembras fertilizadas fue de 4.8 d y 3.6 d para FE y FI, mientras que para NF fue de 7 días.

En la Fig. 2 se compara la capacidad de ovipostura de los tres grupos en períodos de cinco días, es decir, el número acumulativo de ovipositoras cada cinco días, apreciándose que el pico máximo se presentó en el rango de 20 d a 30 d después de la emergencia de las hembras, y disminuyó gradualmente su producción con el transcurso del tiempo. La fecundidad promedio por hembra para cada grupo, es decir, el promedio de huevos de una hembra durante su vida, tomando como base el cohorte inicial de hembras ($\sum \text{huevos} / \sum \text{hembras}$), fue de 66.3, 51.4 y 28.2 para FI, FE y NF respectivamente. Asimismo se determinó que el promedio de ovipositoras fue notablemente mayor en hembras fertilizadas (FI y FE) que en no fertilizadas (NF); las hembras FI pusieron en promedio más huevos (1.32 huevos por hembra por día), superando a las hembras FE (1.26) y NF (0.75). La hembra que produjo más huevos fue del grupo FI, pues ovipositó 139 individuos en 66 d de vida, o sea, un promedio de 2.11 huevos por día.

Al analizar los resultados para buscar si existía diferencia estadística por medio de la prueba U de Mann-Whitney para el caso de muestras pequeñas, en que $n_2 = 20$ (18), no se encontraron diferencias ($P > 0.05$) en cuanto al número de oviposiciones para FE y FI, pero sí se detectaron diferencias significativas ($P < 0.05$) de estos grupos en relación con NF.

Los resultados obtenidos sugieren que la cópula / o la presencia del semen en la espermateca tiene algún efecto estimulador en la fisiología de las hembras, que las incita a una mayor producción de huevos. Al respecto, de Wilde y de Loof (9) mencionaron que varios estímulos recibidos durante el cortejo, la estimulación

láctil durante el acto copulatorio, el llenado de la espermateca por espermatozoides y la estimulación de los ovarios por secreciones del macho, transferidas en el líquido seminal, influyen sobre la oogenésis o en la oviposición directamente, en insectos como *Drosophila*, *Aedes*, *Acanthoscelides*, *Laspeyresia* y *Pieris*, entre otros, por lo que es probable que para *C. stephanoderis* ocurra algo similar.

Parámetros poblacionales

La representación gráfica de la supervivencia (lx) y su relación con las hembras nacidas por hembra por unidad de tiempo (función mx), para los grupos FE y FI, se presentan en la Fig. 3 en períodos de cinco días. Como se puede observar, mx fue mayor en hembras FI, sin embargo, la prueba U de Mann-Whitney (18) no detectó diferencia estadística significativa entre ambos grupos ($P > 0.05$).

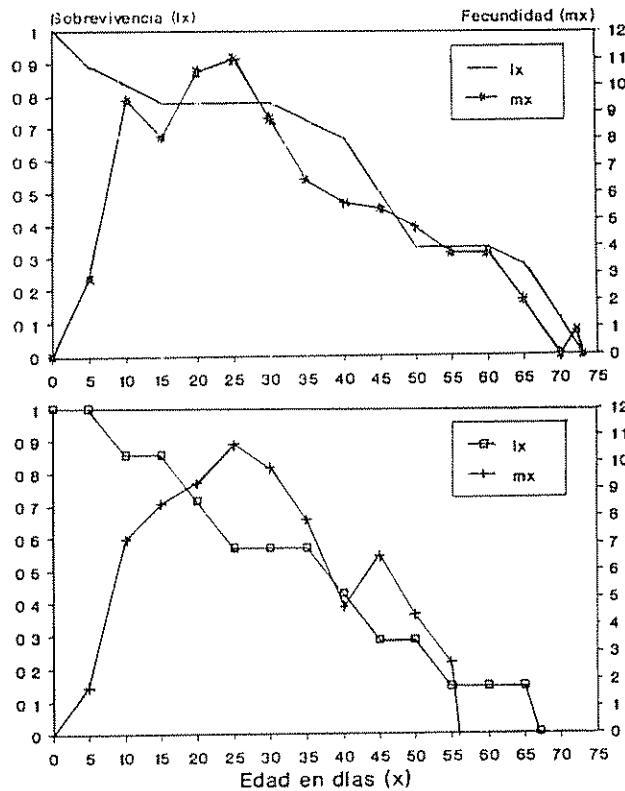


Fig. 3. Relación entre las curvas de supervivencia (lx) y la progenie hembra producida (mx) acumulativa (en rangos de cinco días), de hembras de *C. stephanoderis* fertilizadas dentro (FI) y fuera (FE) de frutos de café. El día cero indica la emergencia de las hembras como adultos

El valor r_0 para el grupo de hembras FE fue de 45 y para hembras FI de 58.04; indicando que bajo condiciones climáticas óptimas y excluyendo otros organismos esta especie es capaz de multiplicarse a sí misma 45 veces y 58.04 veces respectivamente, en cada generación.

El valor r_m fue de 0.1012 y 0.1067 para hembras FE y FI respectivamente. Este parámetro, como afirmó Messenger (14), es uno de los más importantes en este tipo de estudios, ya que es una característica biológica que describe la rapidez con que una población se incrementa cuando ocupa un medio no limitado en espacio y alimento, y en ausencia de enemigos naturales. La estimación del r_m muestra que *C. stephanoderis* posee un buen potencial reproductivo.

Al resumir y comparar otros parámetros poblacionales (Cuadro 1), se puede visualizar el tiempo de desarrollo en promedio de la progenie (TDPP), en que se observa que la descendencia del grupo NF, constituida sólo por machos, tuvo una duración de 19.64 d \pm 0.94 d de huevo hasta adulto; tiempo similar a la duración de la progenie de machos producida por hembras FE (19.5 d \pm 0.72 d) y FI (20.25 d \pm 1.26 d). Respecto al tiempo de desarrollo requerido por las hembras, éste fue de 20.74 d \pm 1.2 d y 20.58 d \pm 1.0 d para los grupos FE y FI, en ese orden.

La tasa de reproducción global TRG fue de 95.34, 83.76 y 61.47 individuos para los grupos FI, FE, y NF, respectivamente; este parámetro (M_x), a diferencia de la fecundidad neta, es el número de huevos producidos con base en la supervivencia diaria del cohorte, por hembras de cada uno de los grupos.

El tiempo generacional (G) fue de 37.61 d y 38.06 d para hembras FE y FI, respectivamente. Estos valores representan el tiempo promedio entre dos generaciones sucesivas. Es decir, el que transcurre desde el nacimiento de las hembras hasta el de sus hijos.

La tasa finita de multiplicación λ fue similar para los grupos FE y FI, obteniéndose los valores calculados de 1.10 y 1.11 (hembra por hembra por día). Este parámetro se interpreta como el número de individuos-hembra agregado a la población por cada hembra, en una unidad dada de tiempo. Finalmente, el tiempo de duplicación λ^2 , es decir el tiempo requerido para que la población duplique su número fue de 6.84 d (FE) y 6.49 d (FI).

Cuadro 1. Parámetros poblacionales del parasitoide *C. stephanoderis* bajo condiciones de laboratorio.

| | | Hembras NF n = 15 p s = 0:1 | Hembras FE n = 7 p s = 7:1 | Hembras FI n = 18 p s = 7:1 |
|-------------|---------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| ODPH | (Huevos por hembra por d) | 0.75 | 1.27 | 1.32 |
| TDPP(d) | (d) machos | 19.64 | 19.50 | 20.25 |
| TDPP | (d) hembras | - | 20.74 | 20.58 |
| TRG | (Huevos por hembra) | 61.47 | 83.76 | 95.34 |
| r_o | (Hembra por hembra) | - | 45.00 | 58.04 |
| r_m | (Hembra por hembra por d) | - | 0.1012 | 0.1067 |
| G | (d) | - | 37.61 | 38.06 |
| λ | (Hembra por hembra por d) | - | 1.10 | 1.11 |
| λ^2 | (d) | - | 6.84 | 6.49 |

NF= Hembras no fertilizadas; FE= Hembras fertilizadas fuera del fruto de café; FI Hembras fertilizadas dentro del fruto de café; p.s.= Proporción sexual; n= Número de individuos observados; ODPH= Oviposuras diarias promedio por hembra; TDPP= Tiempo de desarrollo promedio de la progenie; TRG= Tasa de reproducción global; r_o = Tasa neta de reproducción; r_m = Tasa intrínseca de crecimiento natural; G= Tiempo generacional; λ = Tasa finita de multiplicación; λ^2 = Tiempo de duplicación

De acuerdo con la metodología utilizada, todos los parámetros anteriores fueron calculados sin tomar en cuenta la mortalidad de inmaduros del parasitoide, por lo que el valor de r_m que expresa el potencial reproductivo máximo de la especie, podría estar ligeramente sobrestimado. Resulta obvio mencionar que los parámetros no calculados para hembras NF, se deben a que no pueden dar origen a hembras. En el caso de las hembras fertilizadas, no obstante la ligera variación existente entre sus parámetros estimados, exhibieron tasas de crecimiento muy similares.

Baker *et al.* (4) realizaron un trabajo en el que hicieron infestaciones artificiales de la broca del café, el cual les permitió estimar los parámetros poblacionales de *H. hampei*. Calcularon $r_o = 24.95$, $G = 44.17$ y r_m en 0.075; sin considerar los factores de mortalidad.

Si se comparan los parámetros poblacionales de *H. hampei* con los de *C. stephanoderis*, es notable la superioridad del parasitoide, lo cual, aunado a que *C. stephanoderis* depreda los huevos y larvas de la broca del café, hace suponer que su introducción en México y en otros países de América Central tendría gran éxito para combatir los niveles poblacionales de *H. hampei*.

LITERATURA CITADA

1. BAKER, P.S. 1984. Some aspects of the behavior of the coffee berry borer in relation its control in southern Mexico (Coleoptera: Scolytidae). *Folia Entomológica Mexicana* 61:9-24.
2. BAKER, P.S.; BARRERA, J.F.; VALENZUELA, J.E. 1989. The distribution of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) in southern Mexico: A survey for a biocontrol project. *Tropical Pest Management* 35(2):163-168.
3. BAKER, P.S.; LEY, C.; BALBUENA, R.; BARRERA, J.F. 1992. Factors affecting the emergence of *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) from coffee berries. *England Bulletin of Entomological Research*. (En prensa).
4. BAKER, P.S.; BARRERA, J.F.; RIVAS, A. s.f. Life history studies of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*, Coleoptera: Scolytidae) on coffee trees in Southern Mexico (En preparación)
5. BARRERA, J.F.; GOMEZ, J.; INFANTE, F.; CASTILLO, A.; DE LA ROSA, W. 1989. Biologie de *Cephalonomia stephanoderis* betrem (Hymenoptera: Bethyilidae) en laboratoire. I. Cycle biologique, capacité d'oviposition et émergence du fruit du caféier. *Café, Cacao, Thé* 32(2):101-108.
6. BARRERA, J.F.; BAKER, P.S.; SCHWARZ, A.; VALENZUELA, J. 1990. Introducción de dos especies de parasitoides africanos a México para el control biológico de la broca del caféto *Hypothenemus hampei* (Ferr.) (Coleoptera: Scolytidae). *Folia Entomológica Mexicana* 79:245-247.
7. BARRERA, J.F.; INFANTE, F.; GOMEZ, J.; DE LA ROSA, W.; CASTILLO, A. s.f. Biologie de *Cephalonomia stephanoderis* betrem (Hymenoptera: Bethyilidae) en laboratoire II. Período de desarrollo de hembras y machos, relación de sexos, sobrevivencia y longevidad de adultos. *Café, Cacao, Thé*. (En revisión)
8. CHABORA, P.C. 1970. Studies in parasite host interaction. III. Host race effect on the life table and population growth statistics of the parasite *Nasonia vitripennis*. *Annals Entomological Society of America* 63(6):1637-1642.
9. DE WILDE, J. DE LOOF, A. 1973. Reproduction - endocrine control. 2 ed. In *The physiology of insecta*. M. Rockstein (Ed.) EE.UU., Academic Press. v. 1, 512 p.
10. DOUTY, R.L.; DEBACH, P. 1984. Algunos conceptos y preguntas sobre control biológico. In *Control biológico de*

- las plagas de insectos y malas hierbas. P. DeBach (Ed.) México, Méx., CECSA. 949 p.
11. HAWKINS, B.A.; SMITH JUNIOR, J.W. 1986. *Rhaconotus raslinensis* (Hymenoptera: Braconidae), a candidate for biological control of stalkboring sugarcane pests (Lepidoptera: Pyralidae): Development, life tables, and intraspecific competition. *Annals of Entomological Society of America* 79(6):905-911.
 12. KOCH, V.J.M. 1973. Abundance de *Hypothenemus hampei* Ferr. scolyte des graines de café, en fonction de sa plante hôte et de son parasite *Cephalonomia stephanoderis* betrem en Cote d'Ivoire. Wageningen, The Netherlands Mededelingen Landbouwhogesschool. p 1-85.
 13. KREBS, C. J. 1985. Ecología: Estudio de la distribución y la abundancia. 2 ed. México, Méx., HARLA. 753 p.
 14. MESSENGER, P.S. 1964. Use of life tables in a bioclimatic study of an experimental aphid-braconid wasp host-parasite system. *Ecology* 45(1):119-131.
 15. PAK, G.A.; OATMAN, E.R. 1982. Comparative life table, behavior and competition studies of *Trichogramma brevicapillum* and *T. pretiosum*. *Entomologia Experimentalis and Applicata* 32:68-79
 16. RABINOVICH, J.E. 1970. Vital statistics of *Synthesiomyia nudiseta* (Diptera: Muscidae). *Annals of Entomological Society of America* 63(3):749-752
 17. RABINOVICH, J. E. 1982. Introducción a la ecología de poblaciones animales. Méx., CECSA. 313 p.
 18. SIEGEL, S. 1972. Estadística no paramétrica. 2 ed. Méx., Trillas. 344 p.
 19. SMITH, G.J.C.; PIMENTEL, D. 1969. The effect of two host species on the longevity and fertility of *Nasonia vitripennis*. *Annals of Entomological Society of America* 62:305-308.
 20. SOUTHWOOD, T.R.E. 1978. Ecological methods. 2 ed. England, A. Halstad. 524 p.

LAL, R.; SANCHEZ, P.A. (Eds.) 1992. *Myths and Science of Soils of the Tropics*. Madison, WI, USA, Soil Science Society of America. Spec. Publ. no. 29. 185 p.

Esta publicación analiza y trata de corregir los diferentes mitos sobre ciencia de los suelos en el trópico. Estos mitos tienen su origen en deficientes niveles de información sobre los suelos más importantes de los trópicos y su funcionamiento como ecosistemas.

En los nueve capítulos se resumen los siguientes tópicos: diversidad de los suelos en los trópicos y sus implicaciones para el desarrollo agrícola; dinámica de la materia orgánica en los suelos tropicales; química y fertilidad de los suelos tropicales; aplicación de fertilizantes en el trópico; inoculación de *rhizobia* de leguminosas en los trópicos; fauna del suelo e impacto sobre las propiedades del suelo en el trópico húmedo.

Sin embargo al tratar de cubrir todo el trópico, y no específicamente el trópico seco o el húmedo, algunos capítulos, como por ejemplo sobre clima y produc-

tividad, tienden a perder ligeramente el enfoque con el afán de abarcar demasiado. El tema de la credibilidad y la erosión de suelos hubiera merecido una mayor profundización como el tratamiento de la aplicación de la Ecuación Universal de Pérdida de Suelos, otro de los mitos importantes.

Sin que estas observaciones le resten valor a esta publicación, se brinda una información bien resumida y completa en cuanto a los mitos y conceptos erróneos sobre suelos tropicales. Las referencias bibliográficas generalmente son amplias y ricas y la mayoría de los ejemplos presentados son claros y convincentes, y en lo personal, servir para enriquecer su enseñanza. Esta publicación no debe faltar en las secciones de "suelos tropicales" o "ecología tropical" de las bibliotecas.

WILHELM-GUNTHER VAHRSON
 ESCUELA DE CIENCIAS GEOGRÁFICAS
 UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA (UNA),
 COSTA RICA

Solid and Fluid Sugarcane Fertilization in Brazil¹

L.C.F. da Silva*, A.A. Rodella**, J.O. Filho***, P.H.C. Luz****

ABSTRACT

Sugarcane growers in Brazil have shown great interest in using fluid fertilization to reduce production costs. Normally aquammonia, powdered KCl, rock phosphate, sulfuric and phosphoric acid are used as raw materials for preparing the fertilizer suspension. The purpose of this study was to compare the behavior of solid as compared to fluid fertilizer on sugarcane in Brazil. For this, three trials in ratoon cane (where the aquammonia and urea sources were compared) and two trials in plant-cane (where the behavior of different sources of NPK were observed) were carried out. From the results obtained, it was possible to conclude that the two nitrogen sources (aquammonia and urea) showed similar effects on sugarcane yield increase. Specifically for plant-cane, the different phosphorus sources in NPK formulations showed that the effectiveness of phosphorus response is a function of the level of phosphorus solubility, regardless of fertilizer form (solid or fluid).

COMPENDIO

Los productores de caña de azúcar de Brasil tienen interés por la utilización de fertilización fluida, con el fin de reducir los costos de producción. Normalmente se usa aquamonia, KCl, rocas fosfatadas y ácidos sulfúrico y fósforo como fuentes de materiales para preparar la suspensión de fertilizantes. Este estudio compara el desempeño de fertilizante sólido en relación con el fluido en caña de azúcar en Brasil. Se instalaron tres ensayos en retoño de caña, para comparar las fuentes aquamonia y urea, y dos de planta de caña, para observar el comportamiento de diferentes fuentes de NPK. Los resultados de las dos fuentes nitrogenadas mostraron efectos semejantes en la productividad de caña de azúcar. Específicamente para caña en planta, las diferentes fuentes fosfatadas de formulación N-P-K mostraron que la respuesta al fósforo es función de la cantidad de fósforo soluble, independiente de la forma de fertilizante (sólido o fluido).

INTRODUCTION

The State of São Paulo is the most important sugarcane region of Brazil, with a cultivated area of some 2 000 000 ha.

Sugarcane growers in Brazil have recently shown interest in using fluid fertilization to reduce production costs (2).

Although fluid fertilizers have been used in Europe and the USA for many years (4, 5), in Brazil this form of fertilization has only recently been employed, especially in sugarcane.

In general, the fluid fertilizers are prepared at the sugar mill and alcohol distilleries using aquammonia, rock phosphate, phosphoric acid, sulfuric acid and powdered KCl as raw materials. In this way, rock phosphate reacting with phosphoric and/or sulfuric acid tends to decrease the cost of the fluid fertilizer; in addition, the cost of nitrogen from aquammonia is lower than that of solid forms.

Under Brazilian conditions, the efficiency of fluid fertilizer in sugarcane has not been studied in depth and there are few data available in the literature; therefore, studies comparing solid and fluid fertilizer in sugarcane are required.

According to Wang and Li (6) and Davidson (3), the different nitrogen sources (solid, liquid and gaseous) have shown the same effect in raising cane yield, provided the application is made with due care to avoid N losses by volatilization. Thus, all fertilizers were covered with a soil layer as soon as they were applied.

According to Bittencourt (1), it is possible to decrease phosphorus fertilizer cost in sugarcane by using

¹ Received for publication 22 September 1988.

* Fellow of Brazilian National Research Council (CNPq). IIA/PLANALSUCAR, Araras, São Paulo, Bra.

** IIA/PLANALSUCAR, Araras, São Paulo, Bra.

*** Fellow of Brazilian National Research Council (CNPq) IIA/PLANALSUCAR, Araras, São Paulo, Bra.

**** IIA/PLANALSUCAR, Araras, São Paulo, Bra.

mixture of phosphoric and sulfuric acids and rock phosphate.

The objective of this research was to study different levels of fluid fertilizer on cane and sugar yields as compared with the traditional solid sources, by means of field trials in plant-cane and ratoon.

MATERIAL AND METHODS

Five trials were carried out to compare sugarcane solid and fluid fertilization.

Two trials in a Haplustox soils and one trial in a Tropudalf soil were set up at Santa Adelaide sugar mill - SP to study aquammonia and urea on ratoon crops.

In Haplustox soils, two trials were carried out. One received 100 m³ vinasse/ha as the potassium source and in the other, 130 kg K₂O/ha as KCl were used. Vinasse is a liquid waste material obtained from the alcohol distillation process. One m³ of vinasse is equivalent to 2 kg K₂O. The variety cultivated was SP70-1143 first ratoon, and the trials were set up in August 1984 and harvested in September 1985.

In Tropudalf soils, urea and aquammonia were studied, using 100 m³ vinasse/ha as potassium source. Variety NA56-79, first ratoon, was used. The trial was set up in August 1983 and harvested in July 1984.

Table 1. Chemical soil analyses of trials at Costa Pinto, Modelo and Santa Adelaide sugar mills.

| Sugar mill | pH (H ₂ O) | P | K | Ca | Mg | Al | C (%) |
|-------------------------------------|--------------------------|----|----|------|------|------|-------|
| | | | | | | | |
| Modelo (Haplustult soil) | 4.00 | 30 | 92 | 0.50 | 0.32 | 1.33 | 0.55 |
| Costa Pinto (Quartzpsament soil) | 5.20 | 11 | 26 | 0.55 | 0.52 | 0.22 | 0.52 |
| Sta Adelaide (Haplustox soil) | 4.40 | 9 | 23 | 0.16 | 0.05 | 1.34 | 0.45 |
| Sta Adelaide (Tropudalf soil) | 5.40 | 12 | 26 | 2.50 | 1.20 | 0.11 | 1.44 |

The split plot design was used for the three ratoon trials using four replications (blocks). The nitrogen sources (urea and aquammonia) were considered as primary treatments (plots), while nitrogen levels were studied as secondary treatments (subplots). Each sub-

plot consisted of seven 10 m rows. The three central rows were harvested for cane yield determination.

Tables 2 and 3 show the different treatments. Only the treatments with aquammonia were liquids.

Table 2. Treatments and average yield results, Test F of the two trials set up at Santa Adelaide sugar mill, ratoon cane, in Haplustox soil.

| Sources of nitrogen | N (kg/ha) | Sources of potassium- | | | |
|---------------------|--------------|-----------------------|----------|-----------|----------|
| | | vinasse | HCl | | |
| | | t cane/ha | t pol/ha | t cane/ha | t pol/ha |
| Urea | 0 | 83 | 14.6 | 69 | 11.8 |
| | 50 | 86 | 14.8 | 79 | 13.5 |
| | 100 | 87 | 15.0 | 82 | 14.1 |
| | 150 | 94 | 16.1 | 78 | 13.1 |
| Aquammonia | 0 | 79 | 13.9 | 69 | 11.7 |
| | 50 | 86 | 15.2 | 75 | 12.7 |
| | 100 | 84 | 14.4 | 76 | 12.8 |
| | 150 | 87 | 14.9 | 74 | 12.4 |
| Effects | | F values | | | |
| Sources of N | 2.39 | 1.37 | 28.89 | 44.9** | |
| N' (linear) | 10.13** | 3.97+ | 7.44* | 4.64* | |
| N'' (quadratic) | 0.01 | 0.01 | 7.37 | 5.97* | |
| Sources x N' | 0.52 | 0.56 | 0.71 | 0.83 | |

+ = significant at the 10% level

* = significant at the 5% level

** = significant at the 1% level

Table 3. Treatments and average yield results, F-test of trial set up at Santa Adelaide sugar mill, ratoon cane, Tropudalf soil.

| Sources of nitrogen | N (kg/ha) | t cane/ha | t pol/ha |
|---------------------|--------------|-----------|----------|
| Urea | 0 | 93 | 13.4 |
| | 50 | 92 | 13.2 |
| | 100 | 96 | 13.7 |
| | 150 | 97 | 14.0 |
| Aquammonia | 0 | 90 | 12.7 |
| | 50 | 90 | 13.0 |
| | 100 | 93 | 13.4 |
| | 150 | 100 | 14.4 |
| Effects | | F values | |
| Sources of N | | 0.45 | 0.86 |
| N' (linear) | | 3.90+ | 6.14* |
| N'' (quadratic) | | 0.60 | 0.70 |
| Sources x N' | | 0.48 | 0.94 |

+ = significant at the 10% level

* = significant at the 5% level

Two trials were set up (in Haplustult soil at Modelo sugar mill and in Quartzpsament soil at Costa

Pinto sugar mill) to study NPK fluid as compared to solid fertilization of sugarcane (plant-cane).

Variety NA56-79 was used at Modelo sugar mill (planting in April 1984 and harvest in June 1985) and SP70-1143 at Costa Pinto sugar mill (planting in March 1984 and harvest in June 1985).

A randomized block design with four replications was used for plant-cane. Each plot consisted of seven 15 m rows. The three central rows (10 m) were considered for cane yield determination. The treatments for plant-cane are presented in Table 4.

Table 4. Treatments, average yield results, and statistical analyses of plant cane of trials set up at Modelo sugar mill, (Haplustult soil) and Costa Rica sugar mill (Quartzpsament soil).

| Treatment | Form | | | |
|---|---------|-------------------------------|------------------|-------|
| | N | P ₂ O ₅ | K ₂ O | |
| | (kg/ha) | | | |
| A. Control | 0 | 0 | 0 | - |
| B. Urea + KCl | 60 | 0 | 120 | solid |
| C. Urea + single superphosphate + KCl | 60 | 150 | 120 | solid |
| D. Aquammonia + KCl | 60 | 0 | 120 | fluid |
| E. 5 - 15 - 15 | 60 | 150 | 150 | fluid |
| F. Urea + FAPS ⁽¹⁾ + KCl | 60 | 150 | 120 | solid |
| G. Urea + Rock phosphate ⁽²⁾ + KCl | 60 | 150 | 120 | solid |

| Treatment | Modelo | | Costa Pinto | |
|---|------------|----------|-------------|----------|
| | Sugar Mill | 1 | Sugar Mill | 1 |
| | t cane/ha | t pol/ha | t cane/ha | t pol/ha |
| A. Control | 150 | 19.7 | 62 | 10.6 |
| B. Urea + KCl | 158 | 20.0 | 73 | 12.5 |
| C. Urea + single superphosphate + KCl | 179 | 23.5 | 104 | 17.4 |
| D. Aquammonia + KCl | 161 | 21.3 | 64 | 11.0 |
| E. 5 - 15 - 15 | 177 | 23.5 | 102 | 17.7 |
| F. Urea + FAPS + KCl | 168 | 22.2 | 81 | 14.1 |
| G. Urea - Rock phosphate ⁽²⁾ + KCl | 161 | 21.5 | 73 | 13.1 |
| Test F | 18.26** | 7.29* | 32.12** | 25.55** |
| M.S.D. (5%) | 11 | 2.40 | 26 | 4.89 |
| M.S.D. (1%) | 13 | 2.90 | 32 | 5.89 |
| C.V. (%) | 3 | 5 | 13 | 14 |

(1) 20% P₂O₅ total, 5% P₂O₅ soluble in water

(2) 40% P₂O₅ total, 1% P₂O₅ soluble in water

** significant at the 1% level.

A double-row furrower was used for applying fluid fertilizer in plant-cane through a peristaltic pump driven by the tractor's wheels. To minimize nitrogen losses by

volatilization, the fluid fertilizer was slightly buried in the bottom of the furrow.

For ratoons, fluid fertilizer was applied subsurface (20 cm) using a shank in both sides of the row, by means of equipment which performed fertilizer application, subsoiling and harrowing simultaneously. A centrifuge pump was used for applying the fertilizer.

Solid fertilizers were applied manually in all trials, banded on the row and covered with soil to avoid losses of N by volatilization.

Climatic conditions may be considered normal for all trials, considering the average of rainfall, solar radiation and maximum and minimum temperatures of the last 10 years.

Table 1 shows the chemical soil analyses of trials at Costa Pinto, Modelo and Santa Adelaide sugar mills. Determination of pH was effected using a soil-water ratio of 1:2.5. Phosphorus and potassium were extracted with 0.5 N H₂SO₄. Calcium, magnesium aluminum were extracted with 1.0 N KCl.

RESULTS AND DISCUSSION

Results in terms of cane and sugar yield are shown in Tables 2, 3, 4 and 5. Table 2 shows that, in the Haplustox soil with vinasse, there was a linear cane yield increase with nitrogen fertilization. Both nitrogen sources (aquammonia and urea) showed the same behavior in sugarcane nutrition. Similar effects were observed in terms of tons of pol/ha.

In the same soil, but using KCl as the source of potassium (Table 2), a quadratic effect of nitrogen on cane yield was observed, the urea showing better results than aquammonia. However, the comparative magnitude of the responses between the different nitrogen sources was very low. These tendencies were also found for t pol/ha.

In Tropudalf soils (Table 3), the sugarcane ratoon showed a linear response to nitrogen fertilization in terms of cane and sugar yields. The trial comparative did not reveal any difference between the two sources.

The three ratoon trials did not reveal any significant interactions between nitrogen sources (solid urea x aquammonia) and dosages.

Although the nitrogen sources showed differences in their physical and chemical properties, the effects on cane and sugar yields in the three ratoon trials were similar. This is in agreement with Wang and Li (6) and Davidson (3). Considering that the price of nitrogen in aquammonia is lower than in urea, the feasibility of aquammonia utilization in sugar cane fields becomes more evident. Presently in Brazil, aquammonia costs are 15% lower than urea.

Plant-cane results (Table 4) showed the same results in terms of nitrogen. Table 4 also show that the highest yields were obtained when the NPK solid formulation (urea, single superphosphate and KCC) and the fluid formulation, (5-15-15) completely soluble, were used.

The yields obtained when partially soluble phosphorus (treatment F) and rock phosphote (treatment G) were used in the furrow were lower than those of soluble forms in both trials. These observations are not in agreement with those obtained by Bitencourt (1), which showed economic advantages of the mixture of rock phosphate and H_3PO_4 in fertilizing plant-cane.

CONCLUSIONS

1. Urea and aquammonia showed similar increases in cane and sugar yields.
2. The different phosphorus sources used for NPK fertilization of plant-cane showed that the efficiency of phosphorus is only related to the amount of soluble phosphorus, regardless of form, fluid or solid.

LITERATURE CITED

1. BITTENCOURT, V.C. 1984. Aspectos agronômicos dos fertilizantes fluidos. São Paulo, ANDA, Seminários sobre fertilizantes fluidos. 14 p.
2. CORBINI, J.L. 1983. Aplicação de fertilizantes líquidos na cultura da cana-de-Açúcar. Piracicaba, STAB 2 (2):52-57
3. DAVIDSON, L.G. 1963. Sources of nitrogen for sugarcane in Louisiana. Proceedings of the International Society Sug Cane Tech 11:87-91
4. PALGRAVE, D.A. 1975. Some precursors of modern liquid fertilizer technology. Solutions (Separata) p 38-48.
5. SLACK, A.V.; ACHORN, F.P. 1973. New development in manufacture and use of liquid fertilizers. Londres, Alcmbe House, The Fertilizer Society.
6. WANG, S.C.; LI, K.Y. 1959. The developments of liquid nitrogenous fertilizers in Taiwan sugarcane agriculture. Proceedings of the International Society Sug Cane Tech. 10:424-432.

Eight Year Results from Provenance Trials of *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, *P. oocarpa* and *P. tecunumanii* in the Valle del Cauca, Colombia¹

J.A. Wright*

ABSTRACT

Five trials of provenances and families within provenances of *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, *P. oocarpa* and *P. tecunumanii* were planted in 1982 at sites in the department of Valle del Cauca, Col., using seed supplied by the Oxford Forestry Institute. The eight-year measurements were analyzed to evaluate provenance and family differences for height, diameter outside bark and volume under bark. Families and provenances were significantly different ($p < 0.01$) for the three traits in every trial. The provenances of Rafael and Yucul from *P. tecunumanii* produced, respectively, 34% and 54% more volume per tree than the commercial control of *P. oocarpa* from Mal Paso, Gua. The provenances of *P. caribaea* var. *hondurensis* generally did not produce as much volume per tree as the commercial control of *P. oocarpa*.

COMPENDIO

En 1982 se establecieron en el departamento del Valle del Cauca, Col., cinco ensayos con familias de *P. caribaea* var. *hondurensis*, *P. oocarpa* y *P. tecunumanii*. Se analizaron las mediciones a los ocho años de edad por diferencias de procedencias y familias para las características: altura, diámetro con corteza y volumen por árbol sin corteza. Las familias y las procedencias fueron diferentes estadísticamente ($p < 0.01$) para las tres en cada sitio. Las procedencias Rafael y Yucul de *P. tecunumanii* produjeron, respectivamente, 34% y 54% más volumen por árbol en comparación con el testigo de *P. oocarpa* de Mal Paso, Gua. Las procedencias de *P. caribaea* var. *hondurensis* produjeron menos volumen por árbol que el testigo de *P. oocarpa*.

INTRODUCTION

One of the first stages in a tree improvement program is the testing of species and provenances. Trials of this type with exotic and native species have been underway at Smurfit Carton de Colombia (SCdeC) for over twenty years (5, 11, 15). Coordinated collections and distribution of seed for trials of pines have been undertaken by numerous organizations, including CAMCORE (Central America and Mexico Coniferous Resources Cooperative) and the Oxford Forestry Institute (OFI). Seed for the trials reported in this paper was collected and distributed by the OFI, an effort they have undertaken since 1963 (1).

In contrast to many agricultural crops, the taxonomy and natural ranges of many tropical pine species are imperfectly documented at present. This is especially true of the pines indigenous to Mexico, the Caribbean and Central America. One example of this is the species *P. oocarpa* Schiede. Several of the original

OFI collections of this species (8) have now been reclassified as *P. patula* Schiede and Deppe spp. *tecunumanii* (Eguiluz and Perry) Styles (2, 14) while other authorities would refer to this species as *P. tecunumanii* (6). Debate about taxonomic classification will understandably continue, being essential for the employment of taxonomists. However, the acceptable growth rates and form characteristics of *P. tecunumanii* indicate its potential across a range of sites (3, 4, 17, 18, 21, 22, 23). In addition, the wood density of *P. tecunumanii* has been shown to be adequate (16) and its pulp and paper-making properties compare favorably with other pine species grown under similar conditions (20).

MATERIALS AND METHODS

Trials of family within provenance of *P. caribaea* var. *hondurensis* Barrett and Golfari, *P. oocarpa* and *P. tecunumanii* were planted in 1982 in the department of Valle del Cauca, Col. Details of the trial sites are listed in Table 1. Provenance details are included in Table 2 while full descriptions are given in Greaves (7, 8).

The trial design was six-tree line plots with three to nine replications at a spacing of 3.0 m by 2.5 m. The trees were fertilized at planting and weed competition was controlled with herbicides.

¹ Received for publication 10 January 1992

* Manager, Forestal Research, Smurfit Carton de Colombia AA 6574, Cali, Col

Table 1. Climatic and geographic details of trial sites in the department of Valle del Cauca, Colombia.

| Species | Site | Lat. (°N) | Alt. (masl) | Mean Ann. Precip. (mm) | Mean Ann. Temp. (°C) |
|--|-----------|--------------|----------------|------------------------------|----------------------------|
| <i>P. caribaea</i> var. <i>hondurensis</i> | Aguaclara | 3 67 | 1 400 | 1 000 | 19 |
| | La Suiza | 3 83 | 1 500 | 1 200 | 20 |
| <i>P. oocarpa</i> and <i>P. tecunumanii</i> | La Suiza | 3 83 | 1 600 | 1 200 | 20 |

Table 2. Climatic and geographic details of provenances included in trials in the department of Valle del Cauca, Col.

| Species | Provenance | No. Fam. | Lat. (°N) | Alt. (masl) | Mean Ann. Precip. (mm) | Mean Ann. Temp. (°C) |
|---|---------------------------|-------------|--------------|----------------|------------------------------|----------------------------|
| <i>P. caribaea</i> var. <i>hondurensis</i> | Alamicamba | 4 | 13.57 | 20 | 2 610 | 27.3 |
| | Araslaya | 3 | 15.75 | 10 | 2 654 | - |
| | Culmi | 8 | 15.10 | 600 | 1 325 | 24.3 |
| | Guanaja | 16 | 16.47 | 50 | 2 308 | 27.1 |
| | Karawala | 16 | 12.97 | 10 | 3 897 | 26.4 |
| | Limonos | 16 | 14.05 | 700 | 663 | 22.2 |
| | Mountain Pine Ridge | 16 | 17.00 | 400 | 1 558 | 23.9 |
| | Queensland | 8* | - | - | - | - |
| | Rio Twas | 1 | 15.80 | 10 | - | - |
| | <i>P. oocarpa</i> | Angcles | 16 | 14.12 | 1 300 | 920 |
| Bucaral | | 18 | 15.02 | 1 150 | 900 | 21.6 |
| Bonete | | 15 | 12.83 | 950 | 922 | 21.4 |
| Dipilto | | 4 | 13.72 | 1 100 | 1 143 | 21.4 |
| Mal Paso | | 16 | 15.18 | 1 000 | 1 800 | 22.4 |
| Siguapeque | | 16 | 14.53 | 1 100 | 1 247 | 19.9 |
| Commercial Mal Paso, Guatemala | | - | - | - | - | - |
| Rafael | | 6 | 13.23 | 1 200 | 1 366 | 20.8 |
| <i>P. tecunumanii</i> | Yucul | 16 | 12.92 | 900 | 1 394 | 22.4 |
| | Commercial Phillipines | - | - | - | - | - |
| <i>P. kesiya</i> | Commercial Phillipines | - | - | - | - | - |
| <i>P. merkusii</i> | - | 1 | - | - | - | - |

*The Queensland source of *P. caribaea* var. *hondurensis* is derived from Mountain Pine Ridge, Belize.

Due to the number of families available within a species, the trials were planted so that no more than 50 families were present in any one trial. Thus, there are two trials for each of *P. caribaea* var. *hondurensis* and *P. oocarpa* and *P. tecunumanii* at La Suiza. In Aguaclara, all of the available families of *P. caribaea* var. *hondurensis* were included, though the family representation differs from that at La Suiza (Table 2).

The statistical model was mixed with provenances fixed and families random in agreement with Crockford *et al.* (3) and Kanowski and Nikles (10). The data were analyzed for height(H) and diameter outside bark at 1.4 m above ground(D) and volume inside bark(V). Indivi-

dual tree volumes were derived from the formulas of Lopez (13), as follows:

$$\text{— Volume with bark (VB)} = H \times (0.0002 + 0.01364 \times D + 0.30593 \times D \times D).$$

$$\text{— Percentage bark (B)} = 70.83 - 93.51 \times \text{Square root (VB)} + 41.12 \times \text{VB}.$$

$$\text{— Volume inside bark (V)} = \text{VB} \times (1 - B/100).$$

Increment cores of 8 mm diameter were removed at breast height from two trees of average diameter in each replication for all of the *P. tecunumanii* families

Table 3. Mean square values (MS) and percentage variance accounted for (VC%) for height, diameter outside bark at eight years and volume inside bark at age eight years for provenances and families of *P. oocarpa* and *P. tecunumanii* at La Suiza.

| Trial 1. | | | | | | | |
|---------------|-------|-----------|------|--------------|------|--------------------------|------|
| Source | df | Height(m) | | Diameter(cm) | | Volume (m ³) | |
| | | MS | VC% | MS | VC% | MS | VC% |
| Replication | 8 | 81*** | 3.0 | 69*** | 1.0 | 0.029** | 0.8 |
| Provenance | 5 | 252*** | 6.4 | 174*** | 2.0 | 0.144*** | 3.0 |
| RepxProv | 39 | 20*** | 3.2 | 23 NS | 0.4 | 0.012 NS | 0.6 |
| Family(Prov) | 43 | 42*** | 6.8 | 63*** | 4.2 | 0.042*** | 5.6 |
| RepxFam(Prov) | 343 | 7*** | 0.2 | 19 NS | 0.6 | 0.009 NS | 7.8 |
| Residual | 1 677 | 8 | 80.4 | 18 | 91.8 | 0.009 | 82.2 |
| Total | 2 115 | | | | | | |

| Trial 2. | | | | | | | |
|---------------|-------|-----------|------|--------------|------|--------------------------|------|
| Source | df | Height(m) | | Diameter(cm) | | Volume (m ³) | |
| | | MS | VC% | MS | VC% | MS | VC% |
| Replication | 8 | 69*** | 1.2 | 57** | 0.4 | 0.027* | 0.2 |
| Provenance | 5 | 545*** | 10.6 | 958*** | 9.4 | 0.995*** | 14.3 |
| RepxProv | 40 | 32*** | 4.2 | 19 | 0.0 | 0.015 | 0.2 |
| Family(Prov) | 44 | 28*** | 2.3 | 69*** | 3.5 | 0.043*** | 3.0 |
| RepxFam(Prov) | 343 | 13*** | 6.0 | 22 | 0.8 | 0.014 | 0.1 |
| Residual | 1 624 | 9 | 75.7 | 21 | 85.9 | 0.014 | 82.2 |
| Total | 2 073 | | | | | | |

Table 4. Mean square values (MS) and percentage variance accounted for (VC%) for height, diameter outside bark and volume inside bark at age eight years for provenances and families of *P. caribaea* var. *hondurensis* at La Suiza.

| Trial 1. | | | | | | | |
|---------------|-------|-----------|------|--------------|------|--------------------------|------|
| Source | df | Height(m) | | Diameter(cm) | | Volume (m ³) | |
| | | MS | VC% | MS | VC% | MS | VC% |
| Replication | 5 | 139*** | 4.4 | 39*** | 0.2 | 0.048** | 1.7 |
| Provenance | 6 | 253*** | 7.2 | 446*** | 7.2 | 0.182*** | 7.4 |
| RepxProv | 30 | 67*** | 13.8 | 69*** | 4.7 | 0.030*** | 6.8 |
| Family(Prov) | 39 | 28*** | 3.5 | 58*** | 3.2 | 0.023*** | 2.8 |
| RepxFam(Prov) | 190 | 12 NS | 6.9 | 23 NS | 0.7 | 0.009* | 3.4 |
| Residual | 1 036 | 7 | 64.2 | 22 | 84.0 | 0.007 | 77.9 |
| Total | 1 306 | | | | | | |

| Trial 2 | | | | | | | |
|---------------|-------|-----------|------|--------------|------|--------------------------|------|
| Source | df | Height(m) | | Diameter(cm) | | Volume (m ³) | |
| | | MS | VC% | MS | VC% | MS | VC% |
| Replication | 7 | 359*** | 13.8 | 102*** | 1.6 | 0.162** | 5.1 |
| Provenance | 5 | 163*** | 3.4 | 209*** | 2.4 | 0.117*** | 2.2 |
| RepxProv | 34 | 31*** | 8.5 | 21 NS | 0.2 | 0.014* | 14.9 |
| Family(Prov) | 39 | 19** | 1.4 | 69*** | 3.9 | 0.029*** | 2.7 |
| RepxFam(Prov) | 271 | 11*** | 5.9 | 22 NS | 1.7 | 0.011* | 2.3 |
| Residual | 1 347 | 7 | 67.0 | 20 | 90.2 | 0.009 | 72.8 |
| Total | 1 703 | | | | | | |

Table 5. Mean square values (MS) and percentage variance accounted for (VC%) for height, diameter outside bark and volume inside bark at age eight years of age for provenances and families of *P. caribaea* var. *hondurensis* at Aguacitara.

| Source | df | Height(m) | | Diameter(cm) | | Volume (m ³) | |
|---------------|-----|-----------|------|--------------|------|--------------------------|------|
| | | MS | VC% | MS | VC% | MS | VC% |
| Replication | 2 | 148*** | 33.1 | 225*** | 13.4 | 0.059*** | 23.4 |
| Provenance | 9 | 45*** | 0.3 | 150*** | 2.6 | 0.014*** | 1.3 |
| RepxProv1 | 6 | 9*** | 3.9 | 12 NS | 0.0 | 0.004* | 2.2 |
| Family(Prov) | 27 | 21*** | 12.7 | 65*** | 7.7 | 0.007*** | 5.6 |
| RepxFam(Prov) | 35 | 2 | 1.2 | 20 NS | 3.1 | 0.002 | 0.8 |
| Residual | 338 | 3 | 48.8 | 14 | 73.2 | 0.002 | 66.7 |
| Total | 418 | | | | | | |

Table 6. Mean values for survival percentage (S), height (H), diameter outside bark (D), volume per tree (V) and gravimetric density (G) at eight years of age for provenances of *P. oocarpa*, *P. tecunumanii* and *P. kesiya* at La Sulza.

| Provenance | Trial 1 | | | | Trial 2 | | | | |
|-----------------------|---------|------|------|-------------------|---------|------|------|-------------------|----------------------|
| | S | H | D | V | S | H | D | V | G |
| | (%) | (m) | (cm) | (m ³) | (%) | (m) | (cm) | (m ³) | (kg/m ³) |
| <i>P. oocarpa</i> | 80 | 16.7 | 19.3 | 0.164 | 87 | 17.1 | 20.0 | 0.183 | 397 |
| Angeles | | | | | 74 | 17.0 | 19.5 | 0.184 | |
| Bucaral | | | | | 76 | 16.4 | 18.9 | 0.164 | |
| Bonete | 80 | 15.6 | 19.6 | 0.172 | 74 | 16.1 | 18.9 | 0.167 | |
| Dipilito | 79 | 18.3 | 21.1 | 0.235 | | | | | |
| Mal Paso | 79 | 16.8 | 18.9 | 0.165 | | | | | |
| Siguatopeque | 80 | 17.3 | 19.3 | 0.180 | | | | | |
| <i>P. tecunumanii</i> | | | | | | | | | |
| Rafael | | | | | 80 | 17.8 | 21.9 | 0.245 | 372 |
| Yucul | | | | | 79 | 19.2 | 22.4 | 0.281 | 379 |
| <i>P. kesiya</i> | 81 | 15.5 | 21.4 | 0.204 | | | | | 315 |
| Trial Mean | 84 | 16.8 | 19.4 | 0.178 | 79 | 17.7 | 20.6 | 0.219 | - |
| Standard Error | - | 0.7 | 0.7 | 0.015 | - | 0.8 | 0.6 | 0.017 | |

and for the commercial controls of *P. kesiya* and *P. oocarpa*. The increment cores were measured for length to calculate green volume; following extraction, the dry weight of each core was used to calculate gravimetric density.

RESULTS AND DISCUSSION

Results for the analysis of variance are given in Tables 3 to 5. The level of statistical significance is indicated by *, ** or ***, for the levels of 0.05, 0.01 or 0.001, respectively. The mean survival for provenances in each trial is given in Tables 6 to 8, along with

provenance mean values for height, diameter, volume and gravimetric density, but no statistical comparison was undertaken on survival or gravimetric density data.

Provenances and families were significantly different ($p < 0.01$) for height, diameter and volume in all the trials. However, the residual term accounted for most of the variance in these trials. This would indicate a large amount of variation within plots, which is to be expected for the traits reported (3). The interaction between replication and family was significant for volume ($p < 0.05$) in *P. caribaea* var. *hondurensis* at La Sulza, but not for the other trials.

The provenances Yucul and Rafael from *P. tecunumanii* produced, respectively, 54% and 34% more volume per tree, than the commercial control of *P. oocarpa* from Mal Paso, Gua. The only provenance of *P. oocarpa* to approach the volume production of Yucul and Rafael was Dipilto. Crockford *et al.* (3) also found the Dipilto provenance to perform well. None of the provenances of *P. caribaea* var. *hondurensis* approached the volume per tree of the control of *P. oocarpa*

from Mal Paso, Guatemala. The *P. merkusii* Jungh. and de Vriese included in these trials had very poor survival, although there is no record of the exact seed source. The *P. kesiya* source grew well in the trials at La Suiza, where its volume exceeded that of *P. oocarpa*. This species was not planted in the trial at Aguaclara but a large trial of *P. kesiya* has since been established in that area.

Table 7. Mean values for survival percentage (S), height (H), diameter outside bark (D) and volume per tree (V) at eight years of age for provenances of *P. caribaea* var. *hondurensis*, *P. oocarpa* and *P. kesiya* in La Sulza

| Provenance | Trial 1 | | | | Trail 2 | | | |
|--|---------|-------|--------|---------------------|---------|-------|--------|---------------------|
| | S (%) | H (m) | D (cm) | V (m ³) | S (%) | H (m) | D (cm) | V (m ³) |
| <i>P. caribaea</i> var. <i>hondurensis</i> | | | | | | | | |
| Alamicamba | | | | | 85 | 12.0 | 19.5 | 0.124 |
| Araslaya | 82 | 7.7 | 16.1 | 0.055 | | | | |
| Culmi | | | | | 81 | 14.1 | 22.4 | 0.194 |
| Guanaja | 75 | 10.5 | 20.6 | 0.127 | | | | |
| Karawala | 80 | 10.3 | 19.6 | 0.107 | | | | |
| Limones | 83 | 11.3 | 21.2 | 0.140 | 80 | 12.5 | 21.3 | 0.160 |
| Mountain | | | | | 77 | 13.1 | 21.5 | 0.170 |
| Pine Ridge | | | | | | | | |
| Queensland | 83 | 11.9 | 21.7 | 0.160 | | | | |
| Rio Twas | 78 | 10.2 | 18.8 | 0.104 | | | | |
| <i>P. oocarpa</i> | 81 | 13.92 | 3.7 | 0.208 | 83 | 14.8 | 20.3 | 0.161 |
| <i>P. merkusii</i> | | | | | 38 | 13.5 | 18.9 | 0.123 |
| Trial Mean | 80 | 10.6 | 20.2 | 0.123 | 79 | 13.0 | 21.3 | 0.166 |
| Standard Error | - | 1.3 | 1.3 | 0.027 | - | 0.8 | 0.7 | 0.017 |

Table 8. Mean values for survival percentage (S), height (H), diameter outside bark (D) and volume per tree (V) at eight years of age for provenances of *P. caribaea* var. *hondurensis*, *P. oocarpa* and *P. merkusii* in Aguaclara.

| Provenance | S (%) | H (m) | D (cm) | V (m ³) |
|--|-------|-------|--------|---------------------|
| <i>P. caribaea</i> var. <i>hondurensis</i> | | | | |
| Alamicamba | 98 | 9.91 | 6.9 | 0.071 |
| Araslaya | 89 | 6.91 | 2.0 | 0.031 |
| Culmi | 91 | 10.9 | 19.1 | 0.099 |
| Guanaja | 83 | 9.5 | 15.9 | 0.062 |
| Karawala | 89 | 10.0 | 17.6 | 0.079 |
| Limones | 91 | 9.9 | 17.1 | 0.074 |
| Mountain | 71 | 10.2 | 18.7 | 0.089 |
| Pine Ridge | | | | |
| Queensland | 93 | 10.3 | 17.9 | 0.088 |
| <i>P. oocarpa</i> | 78 | 11.8 | 19.0 | 0.103 |
| <i>P. merkusii</i> | 11 | 9.5 | 18.0 | 0.067 |
| Trial Mean | 83 | 9.9 | 17.3 | 0.078 |
| Standard Error | - | 0.5 | 0.6 | 0.011 |

Ladrach (11, 12) also found the Yucul provenance to be among the best for volume production per tree when evaluated at age eight years. In the department of Cauca, Yucul was among the best provenances for height growth at age three years (9). The trials analyzed in the present study provide new material for inclusion in grafted seed orchards and give an indication of volume productivity on sites previously untested. Numerous trials of families within provenance of *P. tecunumanii* have now been established with seed from CAMCORE. These trials will provide a wide genetic base from which to develop a tree breeding program for *P. tecunumanii*.

The average volume per tree in the La Suiza trial of *P. caribaea* var. *hondurensis* was almost twice that from Aguaclara. As management and overall genetic composition of the two trials were similar, it appears that the climatic and/or edaphic conditions are better at La Suiza.

The mean gravimetric density (Table 6) of *P. kesiya* was 20.6% less than that of *P. oocarpa* and confirms previous findings in Colombia (12). The Rafael and Yucul provenances of *P. tecunumanii* were respectively 6.8% and 4.5% lower in gravimetric density than the *P. oocarpa* commercial control. The superior volume growth of *P. tecunumanii* would result in considerably more dry tons of wood produced per hectare when compared with *P. oocarpa*, as has been observed in other OFI trials (19).

CONCLUSION

No further work is anticipated with *P. caribaea* var. *hondurensis* at these altitudes, though the species does grow well in the Llanos region of Colombia. Selections have been made in the best families of *P. tecunumanii* and these will be included in grafted seed orchards. Seed of *P. tecunumanii* is presently imported from several provenances in Central America for operational plantations. Smurfit Carton de Colombia no longer operationally plants *P. oocarpa*, although a breeding base in trials and seed orchards is maintained.

LITERATURE CITED

- BARNES, R.D.; BURLEY, J. 1990. Tropical forest genetics at the Oxford Forestry Institute: Exploration, evaluation, utilization and conservation of genetic resources. *Forest Ecology and Management* 35:159-170.
- BARNES, R.D.; STYLES, B.I. 1983. The closed-cone pines of Mexico and Central America. *Commonwealth Forestry Review* 62:81-84.
- CROCKFORD, K.J.; DUNSDON, A.J.; BAYLIS, W.B.H.; BIRKS, J.S.; BARNES, R.D. 1990. Evaluation of tropical pine provenance and progeny tests: Final Report. Oxford Forestry Institute 136 p.
- DVORAK, W.S.; BALOCCHI, C.E.; RAYMOND, R.H. 1989. Performance and stability of provenances and families of *Pinus tecunumanii* in the tropics and subtropics. In IUFRO Conference Breeding Tropical Trees: Population Structure and Genetic Improvement Strategies in Clonal and Seedling Forestry (1988, Pattaya, Thailand) Proceedings. G.L. Gibson, A.R. Griffin, A.C. Matheson (Eds.) Oxford Forestry Institute, Oxford, UK; Winrock International, Arlington, Virginia, USA. p. 187-196.
- EASLEY, D.F.; LAMBETH, C.C. 1989. Five-year results of forty-five eucalyptus species growing in the Andean region of Colombia. Cali. Smurfit Carton de Colombia Research Report no. 123. 9 p.
- EGUILUZ, P.I.; PERRY, J.P. 1982. *Pinus tecunumanii*. Una nueva especie de Guatemala. *Ciencia Forestal* 8(41):3-22.
- GREAVES, A. 1978. Descriptions of seed sources and collections for provenances of *Pinus caribaea*. Commonwealth Forestry Institute, Oxford. Tropical Forestry Papers no. 12. 89 p.
- GREAVES, A. 1979. Descriptions of seed sources and collections for provenances of *Pinus oocarpa*. Commonwealth Forestry Institute, Oxford. Tropical Forestry Papers no. 13. 144 p.
- JARA N., L.F. 1981. Provenance trials of *Pinus oocarpa* Schiede in the southwestern region of Colombia, South America. In IUFRO World Congress, (37, 1981, Kyoto, Japan).
- KANOWSKI, P.J.; NIKLES, D.G. 1989. Family structure in provenance trials, conservation stands and genetic base populations. In Breeding Tropical Trees: Population Structure and Genetic Improvement Strategies in Clonal and Seedling Forestry. IUFRO Conference (1988, Pattaya, Thailand) Proceedings. G.L. Gibson, G.L., A.R. Griffin, A.C. Matheson (Eds.) Oxford Forestry Institute, Oxford, UK; Winrock International, Arlington, Virginia, USA. p. 68-78.
- LADRACH, W.E. 1985. Comparison between provenances and sources of fourteen conifers in the Colombian Andes after five years. Cali. Smurfit Carton de Colombia Research Report no. 102. 13 p.
- LADRACH, W.E. 1986. Comparison between provenances of seven conifers in the Andean region after eight years. Cali. Smurfit Carton de Colombia Research Report no. 105. 8 p.
- LOPEZ C., B.R. 1986. Indices de sitio y funciones de producción de *Pinus oocarpa* y *Pinus kesiya* en los departamentos del Valle y Cauca, Colombia: Contract Report. Medellín. 99 p.
- MCCARTER, P.S.; BIRKS, J.S. 1985. *Pinus patula* subspecies *tecunumanii*: The application of numerical techniques to some problems of its taxonomy. *Commonwealth Forestry Review* 64:117-132.
- URREGO, J.B. 1989. Fifth year results of San Jose, Salinas and Guachicono arboreetums. Cali, Smurfit Carton de Colombia Research Report no. 124. 8 p.
- WRIGHT, J.A.; GIBSON, G.L.; BARNES, R.D. 1986. Variation of stem volume and wood density of *Pinus caribaea*, *P.*

- oocarpa* and *P. patula* spp. *tecunumanii* in Zambia. Commonwealth Forestry Review 65:33-40. 1986.
17. WRIGHT, J.A.; GIBSON, G.L.; BARNES, R.D. 1986. Variation of stem volume and wood density of *Pinus oocarpa* and *P. patula* spp. *tecunumanii* at Agudos, Sao Paulo, Brazil. IPEF 32:21-23.
18. WRIGHT, J.A.; GIBSON, G.L.; BARNES, R.D. 1987. Provenance variation in stem volume and wood density of *Pinus oocarpa* and *P. patula* spp. *tecunumanii* growing at two elevations in South Africa. South African Forestry Journal 143:46-48.
19. WRIGHT, J.A. 1987. Provenance variation in wood characteristics of *Pinus caribaea* Morelet and *P. oocarpa* Schiede. Ph D. Thesis. University of Oxford. 153 p.
20. WRIGHT, J.A. 1987. Results of micropulping wood samples of *Pinus caribaea*, *P. elliottii*, *P. oocarpa* and *P. patula* spp. *tecunumanii* in the Eastern Transvaal and Zululand. IV. In Simposio sobre Silvicultura y Mejoramiento Genético de Especies Forestales. (1987, Buenos Aires, Arg.). Buenos Aires, Centro de Investigaciones y Experiencias Forestales. p. 247-256.
21. WRIGHT, J.A.; GIBSON, G.L.; BARNES, R.D. 1988. Provenance variation in stem volume and wood density of *Pinus caribaea*, *P. oocarpa* and *P. patula* spp. *tecunumanii* in Puerto Rico. Turrialba 38:123-126.
22. WRIGHT, J.A.; GIBSON, G.L.; BARNES, R.D. 1989. Variación en volumen y densidad de la madera de ocho procedencias de *Pinus oocarpa* y *P. patula* spp. *tecunumanii* en Conocoto, Ec. IPEF 41-42:5-7.
23. WRIGHT, J.A. 1990. Variation in wood properties of *Pinus oocarpa* and *P. patula* spp. *tecunumanii* provenances at six sites. Silvae Genetica 39(1):1-4.

NOTAS TECNICAS

Hospederos Alternos en Pentatómido: Implicaciones en el Manejo de Plagas ¹

E. Daza*, A. Pantoja *

ABSTRACT

Alternate hosts for three pentatomids: *Oebalus ornatus* (Sailer), *Mormidea pictiventris* sp., and *Mormidea maculata* Dallas, affecting rice in the Valle del Cauca Department, Col., were identified. Eleven weed species were identified as alternate hosts for the three pentatomids. Ten of the weed species belonged to the Gramineae, while only one weed belonged to the Cyperaceae. Weeds of the genus *Echinochloa* spp. and *Paspalum* spp. were the preferred alternate hosts for three pests studied. The widest host range was observed for *P. ornatus*, while the other two pentatomids shared a similar host range.

Palabras clave: Insecta, pentatómidos *Oebalus*, *Mormidea*, hospedantes alternos, malezas.

COMPENDIO

Se identificaron los hospedantes alternos para tres especies de pentatómidos: *Oebalus ornatus* (Sailer), *Mormidea pictiventris* Stal. y *Mormidea maculata* Dallas, que son plagas del arroz en el Valle del Cauca, Col. Se identificaron malezas hospedantes para estos tres pentatómidos. Diez de las malezas identificadas pertenecen a la familia Gramineae y una a la Cyperaceae. Las gramíneas pertenecientes a los géneros *Echinochloa* y *Paspalum* fueron los hospedantes preferidos por las tres especies de pentatómidos estudiados. *O. ornatus* presentó el mayor rango de hospedadores, mientras que las dos restantes especies presentaron un rango más bajo o similar.

INTRODUCCION

El uso del concepto "manejo integrado de plagas" implica la utilización de todas las tácticas disponibles con el fin de eliminarlas, con un menor costo y bajos riesgos para el aplicador y el medio ambiente. Puesto que las malezas sirven de alimentación y albergue para las plagas, la identificación de los hospedantes alternos de éstas es de gran importancia para el desarrollo de programas de manejo integrado de plagas (MIP) y manejo integrado del cultivo (MIC).

En las Américas, *Echinochloa colona* (L.) Link es la maleza con distribución más amplia y se considera como hospedante alternativo para varias especies de insectos (2).

En Colombia, la presencia de *Echinochloa* spp. favorece la migración temprana de chinches y estimula el aumento de la población durante el comienzo de la floración del cultivo de arroz (8).

En la zona del Tolima, *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop y *E. colona* fueron reportadas (3) como hospedantes alternos de *Mormidea* sp.; otra gramínea, *Turnera ulmifolia* L., es hospedante de *Euschistus* sp. (3). Hernández y Parada (4) señalan que, en ausencia de arroz, ese parásito puede sobrevivir en *Leptochloa filiformis*. En Cuba, Meneses y Sánchez (5) informan sobre 22 especies de malezas de las familias Poaceae y Cyperaceae como principales hospedadoras de *O. insularis* y destacan la especie *E. colona* por su abundancia y la preferencia del *O. insularis*.

En el estado de Louisiana (EE.UU.), *Oebalus pugnax* (Sailer) mostró preferencia por el *Paspalum urvillei* sobre arroz Steud (6). Otros hospedadores de *O. pugnax*, en orden decreciente de selección, fueron: *Brachiaria platyphylla* (Griseb.) Nash, *Digitaria ciliaris* (Retz.), *E. colonum* y *P. dilatatum* Poir (6).

En Puerto Rico, Franqui *et al.* (1) listaron diez especies de malezas como hospederos alternos de cinco

¹ Recibido para publicación el 24 de junio de 1992.

Los autores agradecen la asistencia de Eugenio Tascón, por la identificación de malezas, y de Myriam C. Duque, por el análisis estadístico. También las críticas a un borrador de este manuscrito de S. L. Lapointe, A. Fischer y F. Cuevas.

* Programa de Arroz, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Apartado Aéreo 6713, Cali, Col.

especies de pentatómidos recolectadas en campos de arroz. Nueve de las malezas pertenecen a la familia Gramineae y una, *Cyperus iria* L., a la familia Cyperaceae.

Este estudio identifica algunos hospedantes alternos de tres pentatómidos, en campos comerciales de arroz en el Valle del Cauca, Colombia.

MATERIALES Y METODOS

Para establecer el rango de hospedantes alternos, se realizaron observaciones en campos comerciales durante diferentes horas del día. Se identificaron, como hospedantes alternos, malezas en las que se encontró el insecto alimentándose u ovipositando. Los pentatómidos y plantas observados fueron recogidos y transportados hasta el laboratorio para establecer su identidad taxonómica.

Con el propósito de correlacionar la presencia de malezas con la aparición de pentatómidos, se examinaron 687 campos comerciales en la zona del Valle del Cauca. En cada campo se tomaron 300 pases de jama y se clasificó la maleza en el campo, según su abundancia, en alta, baja o ninguna. La presencia de *O. ornatus* (Sailer), especie más abundante en la zona, en campos con y sin malezas, fue comparada mediante la prueba de T. Para realizarla se consideraron los campos con baja y alta maleza como una categoría (enmalezados).

RESULTADOS Y DISCUSION

Se identificaron 11 especies de plantas como hospederos alternos de *O. ornatus*, *Mormidea maculata* Dallas y *M. pictiventris* Stal (Cuadro I). Diez de las especies de malezas pertenecen a la familia Gramineae y una a la Cyperaceae. Los géneros *Echinochloa* sp. y *Paspalum* sp. fueron los hospedantes preferidos por las tres especies de chinches. La especie más numerosa en el Valle del Cauca (*O. ornatus*) (7) mostró el mas amplio rango de hospedadores. Las otras dos especies, *M. pictiventris* y *M. maculata*, presentan un rango de hospedantes menor y similar. Entre las malezas estudiadas, *O. ornatus* prefiere las plantas del género *Echinochloa* spp. La especie *E. colona* resultó ser la única hospedera común a *O. ornatus*, *M. pictiventris* y *M. maculata*, lo cual sugiere que la presencia de esa maleza en arrozales puede inducir al desarrollo de poblaciones de estas tres especies de pentatómidos. La amplia distribución de *E.*

colona(2) podría ser un factor que influya en la selección de esta planta como hospedante para las tres especies de pentatómidos aquí estudiados. *E. colona* también acoge otras especies de chinches que atacan el arroz (1, 5).

M. pictiventris fue el único pentatómido que se alimentó de *Paspalum virgatum* (L.) y *P. conjugatum* Bergins, mientras que *P. plicatulum* Michaux y *E. polistachia* H.B.K.S. sólo sirvieron de hospedadores a *M. maculata*. *Rhynchospora corymbosa* L. fue la única Cyperaceae que sirvió como hospedante alternativo de *O. ornatus* y *M. maculata*. La preferencia por las gramíneas en relación con la familia Cyperaceae puede atribuirse a la mayor densidad de gramíneas durante el periodo de estudio. Es importante señalar que la falta de malezas de hojancha en este estudio se debe a su ausencia en el campo. Los herbicidas usados para el arroz son selectivos, eliminan plantas de hoja ancha pero permiten la supervivencia de algunas gramíneas.

Cuadro 1. Plantas hospederas para tres especies de pentatómidos que afectan el cultivo de arroz en el Valle del Cauca, Col. (1990).

| Plantas hospederas (Familia/Especie) | Especies* | | | |
|---|-----------------|--------------|-----|---------|
| | | Nombre común | o o | M p M n |
| -Gramineae | | | | |
| <i>E. colona</i> (L.) Link | Liendrepuerco | X | X | X |
| <i>E. crusgalli</i> (L.) Beauv | Arrocillo | X | - | - |
| <i>E. crusgalli</i> (H B K) | Arrocillo | X | - | - |
| <i>E. polistachia</i> (H B K) Hitch | Pasto alemán | X | - | - |
| <i>P. virgatum</i> | Paja toruna | - | X | - |
| <i>P. conjugatum</i> Bergins | Gramma común | X | - | - |
| <i>P. distichum</i> L. | Gramma colorada | X | - | - |
| <i>Eriochloa poystachya</i> H B K | Janciro | - | - | X |
| <i>Hymenachne amplexicaulis</i> (Rudge) Nees | Cañizo acuático | X | - | - |
| -Cyperaceae | | | | |
| <i>Rhynchospora corymbosa</i> L. | Cortadora | X | - | X |

Leyenda:

- * O o = *O. ornatus*
- M p = *M. pictiventris*
- M n = *M. maculata*
- X = Indica planta hospedera
- = Indica planta no hospedera

La presencia de los hospedantes alternos encontrados en este estudio en campos comerciales de arroz

puede ser de importancia para el desarrollo y supervivencia de las poblaciones de estas tres especies de chinches. La existencia de malezas en los alrededores y en el campo de arroz permite el desarrollo temprano de poblaciones de chinches, y promueve la emigración desde las malezas al cultivo (1, 8). Además, campos enmalezados presentaron una población significativamente mayor ($P = 0.05$) de *O. ornatus*, que campos libres de malezas; eso demuestra la importancia que tiene la presencia de malezas en la aparición de pentatómidos en un arrozal. El control de malezas en el cultivo del arroz y sus alrededores puede contribuir a mantener bajas las poblaciones de chinches.

CONCLUSIONES

La información que se provee en este estudio es de importancia para los técnicos de campo y los agricultores arroceros. Esta información servirá, además, para el desarrollo de programas relacionados con el manejo de plagas (MIP) y el manejo del cultivo (MIC).

Se determinó que las gramíneas pertenecientes a los géneros *E. paspalum* son los hospederos preferidos por los tres pentatómidos estudiados. Por lo tanto, la presencia de estas malezas podría aumentar la densidad de pentatómidos en los arrozales. Un total de 11 malezas hospedantes fueron identificadas para los tres pentatómidos estudiados.

LITERATURA CITADA

1. FRANQUI, R.A.; PANTOJA, A.; MEDINA-GAUD, S. 1988. Host plants of pentatomids affecting rice fields in Puerto Rico. *Journal of Agriculture of University of Puerto Rico* 72:385-369.
2. GONZALEZ, J.; ARREGOCES, O.; ESCOBAR, E. 1985. Principales malezas en el cultivo de arroz en América Latina. In *Arroz: Investigación y producción*. E. Tascón, E. García (Eds.). PNUD, CIAT.
3. HALLMAN, G. 1976. Importancia de algunas relaciones naturales plantas-artrópodos en la agricultura en la zona cálida del Tolima central. *Revista Colombiana de Entomología* 5:19-26.
4. HERNANDEZ, M. R.; PARADA, O. 1984. Biología, hábitos y hospederos alternantes de la chinche negra del arroz *Euschistus* sp. *Arroz (Col.)* 3:4-11.
5. MENESES, R.; SANCHEZ, E. 1985. Principales plantas hospederas de *Oebalus insularis* (Hemínóptera: Pentatomidae) en la zona arrocera del sur de Arroz 8:39-43.
6. NARESH, J S.; SMITH, C M. 1984. Feeding preference of the rice stink bug on annual grasses and sedges. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 35:89-92.
7. PANTOJA, A.; DAZA, E. 1992. Pentatomids of rice in Colombia: Species and distribution. *Tropical Agriculture (Sub.)*.
8. WEBER, G. 1989. Desarrollo del manejo integrado de plagas del cultivo del arroz: Guía de estudio. Cali, Col., Centro Internacional de Agricultura Tropical. 69 p.

Efecto de los Protozoarios sobre la Nodulación en Frijol (*Phaseolus vulgaris*)¹

O. Acuña*, C. Ramírez*

ABSTRACT

A study was conducted to determine the effect of a soil flagellate on survival and multiplication of *Rhizobium leguminosarum* biovar. *phaseoli* and on nodulation of common beans (*Phaseolus vulgaris*) var. Mexico 80 grown in growth pouches under greenhouse conditions. The plant growth solution in the pouches was inoculated with *Rhizobium* strain CR-409 (CIAT 166) at two densities 1×10^4 and 1×10^8 bacteria ml^{-1} with and without protozoa (1×10^4 and ml^{-1}). Each growth pouch had two plants and each treatment consisted of four growth pouches (replicates). Bacterial counts were made on yeast extract mannitol amended with 5 ppm of brilliant green and the protozoa through the most probable number technique at days 0, 2, 4, 6 and 8 after the treatments were applied. Protozoa reduced the population of bacteria in comparison with the controls with no protozoa at both rates of bacterial inoculation; there was an increase in the protozoan population only at the high rate of inoculation. The decrease in the number of bacteria was also concomitant with a decrease in nodulation, measured as nodule dry weight per plant, from 35.5 mg to 19.6 mg at the low rate of inoculation and from 12.8 mg to 1.4 mg at the high rate of inoculation. Reasons for the difference between the two rates are discussed. The data presented support the view that protozoa may negatively affect nodulation.

COMPENDIO

Se evaluó el efecto de un flagelado (protozoario), aislado del suelo, sobre la supervivencia y multiplicación de *Rhizobium leguminosarum* biovar. *phaseoli*, y la nodulación en frijol común (*Phaseolus vulgaris*) var. México 80, cultivado en bolsas de crecimiento para plantas, en condiciones de invernadero. Se inoculó la solución nutritiva con la cepa de *Rhizobium* CR-409 (CIAT 166) en dos niveles finales de la población, 1×10^4 y 1×10^8 bacterias por mililitro de medio, con y sin protozoarios inoculados (1×10^4) por mililitro. En cada bolsa de crecimiento se sembraron dos plántulas del frijol; en total se dispuso de cuatro bolsas (repeticiones) por tratamiento. Se realizaron recuentos de bacterias en agar, levadura manitol más verde brillante (5 ppm) y de protozoarios mediante la técnica del número más probable, a los 0, 2, 4, 6 y 8 días después de aplicados los tratamientos. La presencia de protozoarios redujo la población de las bacterias en relación con los tratamientos sin protozoarios en ambos niveles de inóculo, solo en el caso del alto inóculo bacteriano hubo aumento de la población de protozoarios. La disminución de la población bacteriana fue acompañada de una disminución en la nodulación en ambos casos, de 35.5 mg en peso pero seco de nódulos por planta a 19.6 mg en el bajo inóculo y de 12.8 mg a 1.4 mg en el alto inóculo bacteriano.

INTRODUCCION

La multiplicación de bacterias del género *Rhizobium* en la rizósfera antecede a la infección y formación de los nódulos radicales en las leguminosas capaces de formar simbiosis (8, 10). En estas estructuras se dan las condiciones fisiológicas adecuadas para que los bacteroides realicen la fijación biológica del N, proceso de relevancia ecológica y agronómica.

La colonización de la rizósfera del frijol y, tal vez, de otras leguminosas por *Rhizobium*, previa a la infección y formación de los nódulos, podría determinar en gran medida el éxito de la inoculación; pero ha sido poco estudiada. Factores físicoquímicos y biológicos afectan la supervivencia y multiplicación de las bacterias en el suelo, a saber: pH, T, humedad, presencia de sustratos, parasitismo, competencia y depredación (1). Las interacciones entre estos factores no se conoce bien, lo que impide mejorar las prácticas de manejo y obtener un mayor beneficio de la fijación biológica de nitrógeno, sobre todo mejorando la nodulación con cepas escogidas, aun en competencia con las nativas, generalmente más competitivas (6).

¹ Recibido para publicación el 15 de junio de 1990.
El presente trabajo fue realizado con fondos del Proyecto VI-733-86-107

* Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica, C R

Investigaciones anteriores han impuesto un papel importante a los protozoarios del suelo en la depredación de bacterias en general (13) y *Rhizobium* en particular (2, 3, 5). Además, Ramírez y Alexander (9)

sugieren que la activa multiplicación bacteriana (incluyendo *Rhizobium*) resultante de la mayor disponibilidad de sustratos de fácil utilización, que proviene del efecto espermosférico y rizosférico en plántulas de frijol común, causa un aumento drástico en la actividad de los protozoarios del suelo, seguida de una reducción en el número de los rhizobia cercanos a 1×10^6 gl (5). Es decir, el flujo de carbono utilizable causa otra dinámica entre presa (bacterias) y depredador (protozoarios), lo que haría pensar en un decrecimiento importante de las poblaciones de *Rhizobium*, a un punto que afectaría la nodulación.

En esta investigación se mejoró la nodulación por cepas inoculadas, al disminuir la actividad depredadora de los protozoarios en los suelos mediante inhibidores, lo cual implica la actividad de los protozoarios; sin embargo, la evidencia no fue directa.

En el presente trabajo se estudió el efecto de los protozoarios aislados del suelo sobre la supervivencia de rhizobia y la nodulación en plántulas de frijol (*P. vulgaris* L.), bajo condiciones controladas. También se muestran datos experimentales del efecto directo de los mismos sobre el patrón de nodulación.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizó la cepa de *R. leguminosarum* biovar. *phaseoli* C.R.-409 (CIAT 166) de la bacterioteca del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica, y la variedad de frijol (*P. vulgaris* L.) "México 80". Las bacterias crecieron en frascos Erlenmeyer de 250 ml con medio extracto de levadura manitol (14) y se incubaron a temperatura ambiente (21°C - 26°C) bajo agitación constante a 120 rpm, durante tres días, hasta alcanzar aproximadamente 1×10^9 ml⁻¹ bacterias por mililitro. Las bacterias fueron lavadas dos veces por centrifugación con solución nutritiva para plantas (12) antes de ajustar la turbiedad de la suspensión bacteriana con el nefelómetro de MacFarland (7) y las inoculaciones a los valores iniciales que se indican el Cuadro 1.

Para aislar el protozoario se humedeció a capacidad de campo un suelo por tres días; luego se tomó una muestra de 1 g y se inoculó en 20 ml de caldo proteosa peptona-sacarosa (1 y 0.5% respectivamente), con el propósito de promover primero la multiplicación bacteriana y, luego, la de los protozoarios. A los cuatro días de incubación, se tomó una muestra para hacer el re-

cuento del número más probable (NMP) de acuerdo con la metodología de Singh (11), pero usando placas de microtítulo. Se utilizó la misma cepa de *R. leguminosarum* como fuente de alimento (presa) para permitir la multiplicación de los protozoarios en los reservorios. Se aislaron los protozoarios de la mayor dilución positiva y se repitió el recuento del NMP para asegurar su homogeneidad al reaislar de la mayor dilución el protozoario (un flagelado).

Cuadro 1. Supervivencia de *Rhizobium leguminosarum* biovar. *phaseoli* y protozoarios del suelo en la solución nutritiva de bolsas de crecimiento con plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) y su efecto sobre la nodulación.

| Días de incubación | Número de rhizobia y protozoa ($\times 10^4$ ml ⁻¹) | | | |
|-------------------------------|--|--------|--------------|--------------|
| | Inóculo bacteria inicial | | Alto | |
| | Bajo | Alto | Protozoarios | Protozoarios |
| | - | + | - | + |
| 0 | 1 | 1 | 100 000 | 100 000 |
| | | (-1) | | (1) |
| 2 | 270 | 420 | 290 000 | 2 000 |
| | | (0.49) | | (10) |
| 4 | 8 700 | 900 | 180 000 | 2 000 |
| | | (0.49) | | (9) |
| 6 | 3 500 | 2 000 | 50 000 | 310 |
| | | (0.98) | | (17) |
| 8 | 270 | 100 | 3 000 | 270 |
| Peso seco nódulos (mg/planta) | 35.1 | 19.6 | 12.8 | 1.4 |

* Número de protozoarios entre paréntesis.

Las semillas de frijol se trataron con solución de cloruro de mercurio acidulado al 0.01% (14) por cinco minutos y se lavaron cinco veces con agua destilada estéril. La germinación se realizó en placas de Petri con agar agua. Las plántulas con una radícula de 2.5 cm se trasplantaron a las bolsas de crecimiento estériles, que contenían 100 ml de solución nutritiva para plantas (12). Una vez que las raíces alcanzaron la solución en el fondo de la bolsa de policarbonato, las soluciones se inocularon con las bacterias para obtener dos concentraciones, 1×10^9 y 1×10^4 bacterias por mililitro. A la mitad de las bolsas se le añadió una suspensión de protozoarios purificados (*vide ante*) a una concentración de 1×10^4 . Las bolsas de crecimiento fueron inoculadas en un número relativamente alto de protozoarios (10^4 ml⁻¹) con el fin de contar, desde un inicio, con una presión alta de depredación en la solución. Durante el experimento, diariamente, se reajustó el contenido de agua en 100 mililitros. Cada vez se tomaban las muestras. Se usaron dos plantas por bolsa y

cuatro repeticiones en un diseño de irrestricto al azar. A los 2, 4, 6 y 8 días después de la inoculación, se elaboraron recuentos de bacterias y protozoarios. Para las bacterias se usó la técnica de dilución en placa sobre medio ALM + 5 ppm de verde brillante y para el recuento de protozoarios la técnica de NMP. El peso seco de nódulos se determinó a los 20 días de aplicados los tratamientos.

RESULTADOS Y DISCUSION

El Cuadro 1 presenta los resultados obtenidos. En todas las plantas se esperaba nodulación, pues la solución-baño se inoculó con rhizobia compatible y efectiva con la variedad de frijol empleada. Las bacterias inoculadas con un número bajo fueron estimuladas por los exudados radicales del frijol, capaces de multiplicarse en la solución que bañaba las raíces y migrar hasta los sitios de infección desde los pelos radicales, ya fuera por arrastre de la solución-baño debido a la capilaridad del papel o por quimiotaxis positiva. Los protozoarios, cuya única fuente de alimento fueron las bacterias, estaban tanto en la solución nutritiva como en las raíces y, en estas condiciones experimentales, se permitió el estudio de su efecto directo sobre la nodulación.

Por el método de aislamiento empleado había certeza de que el flagelado en cuestión, era capaz de reproducirse aprovechando exclusivamente las bacterias como fuente de alimento. En este caso el protozoario se escogió para probar la hipótesis de que la depredación, bajo las condiciones experimentales empleadas, era capaz de alterar el patrón de nodulación. De estos resultados no se puede inferir que en el suelo, donde se aisló el mismo, sea el principal agente depredador de las bacterias si estas fueron inoculadas a las mismas dosis en suelo sin esterilizar. Tampoco se puede generalizar la importancia del flagelado en otros suelos, pues las poblaciones son bastante heterogéneas y, posiblemente, varias especies de protozoarios se estimulan al añadir una presa como *Rhizobium*.

La única fuente de sustratos para las bacterias fueron los radicales exudados por las plántulas de frijol, al ser capaces de multiplicarse en la solución que bañaba las raíces. Hecho que fue más notorio en el tratamiento sin protozoarios; a los cuatro días de incubación mostró un total de 8.7×10^8 rhizobia, cerca de un factor 10 más grande, comparado con el tratamiento con protozoario. A los seis y ocho días de incubación las proporciones no variaron. El número de protozoarios

fue constante, lo que indica que la multiplicación bacteriana en los exudados fue apenas suficiente para mantener la población inoculada al inicio. Por otro lado, la población máxima obtenida sin protozoarios representaría el potencial límite de colonización *Rhizobium* que resulta del aprovechamiento de los exudados radicales en las condiciones experimentales empleadas.

La caída brusca de la población rhizobia del día cuarto al octavo no se puede explicar con claridad, a menos que existiera lisis y/o aglutinación de las bacterias. De toda forma, los protozoarios fueron capaces de reducir drásticamente la nodulación pues la misma fue la mitad en relación con la inoculación en el nivel bajo con *Rhizobium* (19.6 versus 35.1 mg por planta, peso seco de nódulos). Estos resultados evidencian una correspondencia entre la cantidad de bacterias en la solución y la nodulación durante el experimento. Cabe recordar que en el momento de inocular la solución-baño con los diferentes tratamientos, las plántulas de frijol presentaban ya pelos radicales y, por lo tanto, eran susceptibles de ser noduladas.

Los resultados conseguidos en el nivel alto de inoculación con *Rhizobium* (10^9 ml⁻¹) mostraron un aumento de la población bacteriana hasta 2.9×10^9 que perfectamente se debería al uso de sustratos y/o la utilización de las reservas endógenas de las bacterias al inocularse. De todas maneras, el aumento relativo de la población bacteriana, en ausencia de protozoarios, fue mucho menor en cuatro días; en el caso del nivel bajo de inóculo apenas se duplicó la población mientras que en el último aumentó casi por un factor de 10 000. Esto indicaría que la cantidad de exudados radicales no fue suficiente para soportar la multiplicación de una población bacteriana tan alta y/o a la existencia de otros factores limitantes del crecimiento. El hecho que sea la primera alternativa está determinado por los resultados obtenidos en el nivel bajo de inóculo, donde la colonización bacteriana no alcanzó niveles muy altos. En niveles altos de inóculo hubo una caída drástica de la población bacteriana, situación para la que no hay una explicación clara. Los protozoarios se reprodujeron en el nivel alto de inóculo bacteriano, por un factor de 10 al cabo de dos días, para llegar a un máximo de 1.7×10^5 en seis días. En el octavo día a pesar de que el número sobreviviente de bacterias fue similar al existente en el nivel bajo de inóculo sin protozoarios, la nodulación fue apenas perceptible. Aunque se hizo el recuento en la solución-baño, no se pudo descartar que parte del efecto de los protozoarios sobre la nodulación se debía a la depredación directa de los flagelados en las cerca-

nías o en los pelos radicales. Además, la excreción de amonio de los protozoarios (13) puede haber inhibido la nodulación (4).

La nodulación observada en ausencia de protozoarios fue menor que en el nivel bajo de inoculación. Posiblemente la lisis y/o la saturación de los sitios de infección la afectaron.

Los resultados presentados muestran una evidencia directa de que, en un sistema controlado, la presencia de protozoarios afecta decididamente la nodulación. Esta información es importante para entender los factores ecológicos que afectan el proceso en condiciones de campo y subraya el valor de realizar más estudios para determinar el papel de la depredación en la nodulación *in situ*. Desde el punto de vista práctico los resultados sugieren que una estrategia válida para aumentar la colonización y la nodulación es la inhibición temporal de los protozoarios del suelo durante el período que antecede a la infección (1, 9).

LITERATURA CITADA

1. ALEXANDER, M. 1985. Enhancing nitrogen fixation by pesticides: A review. *Advances in Agronomy* 38:267-282.
2. CHAO, W.; ALEXANDER, M. 1981. Interactions between protozoa and *Rhizobium* in chemically amended soil. *Soil Science Society of America Journal* 45:48-50.
3. DANSO, S.; KEYA, S.; ALEXANDER, M. 1975. Protozoa and the decline of *Rhizobium* populations added to soil. *Canadian Journal of Microbiology* 21:884-895.
4. GIBSON, A.H.; JORDAN, D.C. 1983. Ecophysiology of nitrogen fixing systems. In *Physiological plant ecology. III. Responses to the chemical and biological environment*. Encyclopedias of Plant Physiology. O.L. Lange, P.S. Nobel, C.B. Osmond, H. Ziegler (Eds.) New York, Springer Verlag. v. 12 c, p. 301-390.
5. HABTE, M.; ALEXANDER, M. 1977. Further evidence for the regulation of bacterial populations in soil by protozoa. *Archives for Microbiology* 113:181-183.
6. HALLIDAY, J. 1985. Biological nitrogen fixation in tropical agriculture. In *Nitrogen fixation research progress*. H.J. Evans, P.J. Bottomley, W.E. Newton (Eds.) Martinus Nijhoff, Dordrecht p. 675-681.
7. PAIK, G. 1970. Reagents, stains and test procedures. In *Manual of clinical microbiology*. J.E. Blair, E.H. Lennette, J.P. Truant (Eds.). Bethesda, American Society for Microbiology. p. 675-692.
8. PARKER, C.; TRINICK, M.J.; CHATEL, D.L. 1977. Rhizobia soil and rhizosphere inhabitants. In *A treatise on dinitrogen fixation. IV. Agronomy and ecology*. R.W.F. Hardy, A.H. Sibson (Eds.) New York, Wiley-Interscience. p. 311-352.
9. RAMIREZ, C.; ALEXANDER, M. 1980. Evidence suggesting protozoan predation on *Rhizobium* associated with germinating seeds and in the rhizosphere of beans (*Phaseolus vulgaris*). *Applied and Environmental Microbiology* 40: 492-499.
10. ROLFE, B.G.; GRESSHOF, P.M. 1988. Genetic analysis of legume nodule initiation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 39:297-319.
11. SINGH, B.N. 1955. Culturing soil protozoa and estimating their numbers in soil. In *Soil zoology*. D.K. McKeven (Ed.) London, Butterworth's Scientific Pub. p. 403-411.
12. SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H.J. 1985. Methods in legume-*Rhizobium* technology. Honolulu, University of Hawaii, College of Agriculture and Human Resources, NIFTAL Project. 367 p.
13. STOUT, J.D. 1980. The role of protozoa in nutrient cycling and energy flow. *Advances in Microbial Ecology* 4:1-40.
14. VINCENT, J. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. Oxford, Blackwell Scientific Publ. 164 p.

Observaciones Preliminares sobre la Diseminación del Caldén (*Prosopis caldenia* Burk)¹

R. Peinetti*, C. Cabezas*, M. Pereyra*, O. Martínez*

ABSTRACT

The "caldenal" is a xerophytic open forest dominated by *Prosopis caldenia* Burk. The use of this resource as forage for cattle may be associated with an increased number of juvenile *P. caldenia* trees. The presence of the propagule of *P. caldenia* in fresh cow dung collected during the fruiting period was analyzed. There were 821 free seeds (n = 10) and 218 seeds inside the bony (protective) ovulary carpels. Fifty-five seedlings emerged in dung after 20 days of incubation. After a longer period of incubation (6 months), the number of seedlings remained unchanged. A large number of seeds were able to germinate after cow consumption and their germination was increased by mechanical scarification. The high propagule number and viability found in the dung indicate that consumption by cattle favors seed dissemination of *P. caldenia*.

Palabras clave: *Prosopis*, diseminación endozoica, germinación, emergencia de plántulas.

COMPENDIO

P. caldenia es la especie dominante de la formación arbórea conocida como "caldenal" en la región semiárida de Argentina. Su diseminación, aparentemente, fue favorecida con el uso del "caldenal" como recurso forrajero para el ganado vacuno. Se realizó un análisis cuantitativo de los propágulos de caldén en deyecciones frescas de vacuno recolectadas durante el período de fructificación. De un total de 10 deyecciones analizadas se encontraron 821 semillas libres y 218 artejos. Cuando las deyecciones fueron mantenidas en invernáculo, se determinó la emergencia de 55 plántulas en 20 días. Valor que no aumentó luego de seis meses de observaciones. Un alto porcentaje de semillas consumidas por el ganado mantienen su capacidad de germinación; favorecida con la escarificación mecánica. El elevado número de semillas viables en las deyecciones permite suponer que el ganado vacuno favorecería la diseminación del caldén.

INTRODUCCION

El caldenal es una formación boscosa abierta característica de la región semiárida de Argentina, donde el caldén (*Prosopis caldenia*) constituye la especie dominante del estrato arbóreo. Su explotación como recurso forrajero para el ganado vacuno produce cambios en sus características estructurales, que conducen al desarrollo de un estrato arbustivo formado por individuos jóvenes de caldén (1).

El fruto del caldén es una vaina indehiscente constituida por numerosos artejos, que podría estar sujeto a diseminación. En otras especies del género *Prosopis* se ha determinado que la presencia de plántulas está asociada a los excrementos de los herbívoros que se ali-

mentan de legumbres (2, 3). En el caso del caldenal, la diseminación endozoica podría ser la causa principal que favorece la aparición de numerosos individuos jóvenes de caldén.

Además no es posible descartar la aparición de nuevos individuos a partir de los frutos no consumidos por los animales y que permanecen en la superficie del suelo (diseminación directa), aunque la magnitud e importancia relativa de esta vía de diseminación aún no ha sido determinada.

En el presente trabajo se realizó un análisis descriptivo de la diseminación del caldén por vías endozoica y directa. Se efectuaron observaciones sobre el tipo, cantidad y capacidad para germinar de los diseminulos presentes en excrementos de vacunos, así como la emergencia de plántulas en las deyecciones y a partir de frutos intactos.

Esta información preliminar es necesaria para el posterior análisis cuantitativo de los mecanismos de repoblación de la especie.

¹ Recibido para publicación el 14 de agosto de 1991.

* Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de La Pampa, Santa Rosa, Arg.

MATERIALES Y METODOS

Diseminación endozaica

En la primera quincena de marzo de 1989 (caída de las vainas), se recolectaron al azar 23 deyecciones frescas de vacunos en un bosque de caldén ubicado en Colonia Lagos (36°32' lat. S, 64°30' long. O), provincia de La Pampa, Arg. Diez deyecciones fueron mantenidas en invernáculo durante 20 d con aplicación de riegos periódicos. En ese tiempo se determinó las semillas y artejos presentes en cada deyección (lavado a través de un tamiz de 1 mm de malla). La totalidad de los diseminulos se llevaron a germinar a 25°C y oscuridad continua. En experiencias previas con semillas libres, frescas y escarificadas, se determinó que estas condiciones permiten obtener el 100% de germinación en 48 horas.

Se registró el número de semillas germinadas cada 10 d durante cuatro meses. Finalmente se efectuó la escarificación mecánica (corte de las cubiertas) de las semillas libres y de las extraídas de los artejos, las cuales se llevaron a germinar a 25°C y oscuridad continua. Transcurridas 72 horas, se registró el número de semillas germinadas.

Un segundo grupo de 13 deyecciones se mantuvo en invernáculo durante seis meses con riegos periódicos. En ese tiempo se determinó el número de plántulas emergidas.

Diseminación directa

Durante la primera quincena de agosto de 1989, se recogieron del suelo del bosque vainas del período de fructificación febrero-marzo del mismo año. Se separaron 1300 artejos a partir del material recogido y se determinó el estado de conservación de las semillas presentes. El resto de los frutos se mantuvo en invernáculo durante cuatro meses sobre suelo y mantillo del bosque. En ese tiempo se aplicaron riegos periódicos y se registró la emergencia de plántulas.

RESULTADOS Y DISCUSION

Diseminación endozaica

Transcurridos 20 d después de la recolección de las deyecciones, se observó la emergencia de un pequeño

número de plántulas a pesar de la importante cantidad de semillas libres y artejos presentes (Cuadro 1).

Cuadro 1. Número de plántulas, semillas y artejos de *P. caldenia* presentes en deyecciones de vacunos 20 días después de su recolección en la región semiárida de Argentina.

| | Plántulas | Semillas | Artejos |
|------------------------|-----------|----------|---------|
| Total | 55 | 821 | 219 |
| Promedio por deyección | 5.5 ± 2.3 | 82 ± 23 | 22 ± 15 |

La abundancia de semillas libres en excrementos de vacunos y el bajo número de plántulas emergidas coinciden con las observaciones realizadas por Eilberg (2) en otra especie del género *Prosopis* (*P. ruscifolia* Griseb.).

Cuando los diseminulos permanecieron durante seis meses en las deyecciones, el número de plántulas emergidas (45 plántulas) resultó semejante al observado a los 20 d (55 plántulas).

Al cabo de cuatro meses de incubación en cámara de crecimiento, germinó un tercio de las semillas libres (65 semillas) (Cuadro 2). Transcurridos 10 d después del inicio de la incubación, este número decayó y a partir de los 50 d se estabilizó en un valor cercano a 15 semillas germinadas cada 10 días.

Cuadro 2. Porcentajes de germinación obtenidos a partir de semillas libres y de artejos de vainas de *P. caldenia* incubadas durante cuatro meses.

| | Semillas libres | Artejos |
|---------------|-----------------|---------|
| Intactas | 33 ± 19 | 7 ± 5 |
| Escarificadas | 21 ± 13 | 2 ± 4 |

Con la escarificación mecánica se logró una germinación del 22% de las semillas restantes en un corto período (72 h). Esta respuesta indica que existe algún tipo de impedimento a la germinación impuesta por las cubiertas seminales. La presencia de semillas libres dormantes (impermeabilidad de las cubiertas) en excrementos de vacunos ha sido indicada para otras especies del género *Prosopis* (2).

La germinación obtenida a partir de los artejos fue baja (7%), y no es posible descartar que una alta proporción no contengan semillas viables.

Diseminación directa

Después de cinco meses de permanencia de las vainas en el suelo del bosque, el 92% de los artejos (sobre un total de 1300) presentó semillas deterioradas (aparentemente no viables). Se observó la emergencia de plántulas (10 en total) aun cuando los frutos se incubaron durante cuatro meses en invernáculo.

CONCLUSIONES

La presencia de un gran número de semillas libres y viables de *P. caldenia* en deyecciones de vacunos indica que el ganado podría favorecer la diseminación.

La respuesta a la escarificación mecánica señala que el efecto abrasivo al pasar por el tracto digestivo no eliminó la dormición de las semillas. Para conocer la dimensión real de este efecto, es necesario determinar el estado de dormición de las semillas antes de ser ingeridas por los animales.

La cantidad de plántulas emergidas en las deyecciones fue muy baja en relación con la cantidad de semillas libres presentes y con los porcentajes de germinación obtenidos. La momificación progresiva de las deyecciones podría explicar las divergencias observadas entre germinación y emergencia.

Solamente una pequeña proporción de los frutos que permanecen en el suelo del bosque poseen la capacidad de generar nuevos individuos.

LITERATURA CITADA

1. CANO, E.; FERNANDEZ, B.; MONTES, M. 1980. Vegetación. In Inventario integrado de los recursos naturales de la provincia de La Pampa. INTA, Provincia de La Pampa, Universidad Nacional de La Pampa. Buenos Aires.
2. EILBERG, B.A. 1973. Presencia de diseminulos de vinal (*Prosopis ruscifolia* Griseb.) en deyecciones de equinos y bovinos. Ecología (Buenos Aires) 1:56-57.
3. SOLBRIG, O.; CANTINO P.D. 1975. Reproductive adaptations in *Propopis* (Leguminosae, Mimosoideae). Journal of the Arnold Arboretum 56:398-412.

VERGARA BENITO S. 1992. A Farmer's Primer on Growing Rice. Manila, IRRI. 219 p.

Publicación especialmente diseñada para la labor docente tanto con estudiantes de diferentes niveles académicos como con agricultores. Se da especial importancia a tres grandes áreas: la planta de arroz, manejo del cultivo y análisis y mejoramiento del cultivo.

En forma clara y sencilla se utilizan gráficos sobre temas relacionados con la planta de arroz; como por ejemplo las fases de crecimiento de la planta, indicando brevemente su ocurrencia, duración e influencia de algunos aspectos ambientales. Trata también de los diferentes tipos de semillas existentes; su anatomía y composición, sin dejar de lado las diferentes etapas de la germinación, así como las necesidades de agua, aire y temperatura requeridas en el proceso.

Se tratan también los factores que afectan el crecimiento de las plántulas de arroz, entre los que se mencionan la profundidad del agua, la temperatura, la cantidad de agua, la intensidad lumínica, el efecto de la baja intensidad lumínica y la cantidad de nutrimentos. Asimismo se describen aspectos relacionados con la anatomía y crecimiento de la hoja; origen, funciones, desarrollo y distribución de las raíces.

Al hablar de los tallos (macollas), se indican tipos, patrón de macollamiento, mecanismos para calcular el número de tallos productivos y efectos sobre el macollamiento, causados por la variedad, distancia entre plantas, época de siembra y niveles de nitrógeno. En relación con las panículas, se describe el crecimiento y desarrollo durante la fase reproductiva, la anatomía de la espiguilla, las diferentes etapas de la formación del grano y las causas de la presencia de granos vacíos o florecillas estériles. Se explican los aspectos relacionados con la dormancia o latencia de las semillas, sus ventajas y desventajas.

Al considerar la producción de carbohidratos se analizan los efectos de las partes verdes de la planta, luminosidad, cantidad de dióxido de carbono en el aire y de agua.

Finalmente se hace una revisión del valor del agua como componente de la planta, como materia prima en la producción y arrastre de alimentos, como protectora de la planta al darle un medio ambiente adecuado a las hojas y, en general, una adecuada turgencia a la planta.

En cuanto al manejo del cultivo, se establece cómo seleccionar plantas adecuadas. Para ello se consideran aspectos relacionados con la altura, crecimiento, longitud de la hoja, efecto de la iluminación, de las plagas y el crecimiento radical.

En cuanto al trasplante, se indica cómo ejecutarlo, número de plántulas por golpe de siembra, razones para transplantar a una profundidad adecuada, corte de las hojas de las plántulas antes del trasplante y adecuado espaciamiento a distancia entre plantas.

Sobre la fertilización se establece el tipo de nutrimentos que la planta de arroz necesita; se indican los fertilizantes orgánicos e inorgánicos y se habla sobre el nitrógeno y las necesidades de este elemento para el cultivo, en invierno y en verano, y su relación con la fertilidad del suelo, potencial de producción de la variedad y ganancias.

Las consideraciones acerca del incremento de la eficiencia del fertilizante nitrogenado contemplan la aplicación de cantidades adecuadas, uso de variedades modernas, aplicación oportuna del fertilizante, mantenimiento del campo libre de malezas y de la humedad en el campo, mezcla del fertilizante con el suelo y la no aplicación cuando las hojas están húmedas. Se fundamenta el uso del fertilizante nitrogenado en la estación seca.

Para el caso de las malezas y su control se establece su importancia indicando las más comunes; sus efectos sobre el uso de los fertilizantes y las pérdidas de cosecha cuando no se controlan en los primeros estados de crecimiento del cultivo. También se mencionan los diferentes métodos de control tales como: el manual, el mecánico, el manejo del agua, la preparación del suelo, el control por competencia y el control químico.

Se establecen los tipos de herbicidas según su formulación, época de aplicación, selectividad y tipo de acción, dando especial importancia a las toxicidades o daños causados por el uso inadecuado o excesivo.

El manejo del agua es un factor sobresaliente para la producción de altos rendimientos en arroz; se establecen sus fuentes y pérdidas; mecanismos para prevenir esas pérdidas; etapas críticas en el manejo del agua y, finalmente, manejo de malezas por medio del agua.

En el análisis y mejoramiento del cultivo se consideran factores, tales como, el alto potencial de producción de variedades modernas, resistencia a insectos y enfermedades, calidad del grano preferida por los consumidores, adaptabilidad a una amplia gama de condiciones ambientales, incluyendo la tolerancia a problemas específicos de suelos en una localidad y duración deseada de crecimiento.

En esta sección, además de los factores considerados para seleccionar una variedad de siembra, se estudian otros aspectos tales como el tipo de planta de alto rendimiento para el cultivo de tierras bajas, los factores que afectan el volcamiento, evaluación de un cultivo a la floración y, finalmente, los componentes de cosecha y uso.

JOSE ISRAEL MURILLO
SAN JOSE, COSTA RICA