

TURRIALBA

REVISTA INTERAMERICANA DE CIENCIAS AGRICOLAS

VOLUMEN 39

ABRIL-JUNIO 1989

NUMERO 2

CODEN: TURRAB 39(2):131-277

Calibración de los parámetros de EUF-N, en relación a los cultivos de lechuga y de veza. J. A. Diez	131
Comparative attractiveness of floral fragrance oils of "RIM" and "Catongo" cultivars of cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) to Diptera in a Costa Rican cacao plantation. A. M. Young	137
Efectos de la reforestación con <i>Pinus radiata</i> sobre la diversidad y abundancia de los micromamíferos en un agroecosistema de Chile central. A. Muñoz, R. Murua	143
Development and fecundity of the southwestern corn borer, <i>Diatraea grandiosella</i> dyar (Pyralidae, Lepidoptera), as affected by host plant water stress. M. Aslam, R. J. Whitworth, J. R. Goodin	151
Micropropagación de tres aráceas comestibles libres de virus. I. Gómez, M. Monge, R. Valverde, O. Arias, T. Thorpe	155
Biología y tabla de vida de <i>Typhlodromus pilosus</i> chant (ACARI: Phytoseiidae) en Costa Rica. H. Aguilar, L. A. Salas	162
Actividad nitrato reductasa en hoja, tallo, raíz y nódulo de <i>Lotus corniculatus</i> en simbiosis con <i>Rhizobium loti</i> . J. Monza, M. J. Delgado, E. J. Bedmar	170
Survival of <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>malvacearum</i> in soil. A. M. Alippi	176
Flujo preferencial de agua y solutos en un suelo tropical sin disturbar. E. Solórzano, R. Radulovich	179
Vigor híbrido y capacidad combinatoria en trigo (<i>T. aestivum</i> L.) para rendimiento y sus componentes, macollaje, altura y ciclo a espigazón. M. R. Simón	184
Electroforesis de proteínas y esterases como método químico de identificación en papas. A. Contreras, R. Mansilla	193
Charcoal rot screening procedure and virulence of <i>Macrophomina phaseolina</i> isolates on dry edible beans. G. S. Abawi, M. A. Pastor-Corrales	200
Valor nutritivo del fruto del árbol de conacaste (<i>Enterolobium cyclocarpum</i>) en bovinos jóvenes. M. A. Ortiz, J. M. González, R. Bressani	209
Comparison of two breeding methods in corn. III. Yield of selected fourth-cycle lines from each population and method. J. A. Morera	223
Comparison of two breeding methods in corn. IV. Correlation of inbred lines (S_1 parents) and testcross performance. J. A. Morera	226
Burn quality prediction for simulation of the agricultural system of Brazil's transamazon highway colonists. P. M. Fearnside	229
Selecao de estirpes de <i>Rhizobium</i> para o feijoeiro. I. Precocidade para nodulação e fixação do nitrogenio. C. A. Barradas, M. Hungría	236
Interspecific hybridization of <i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>P. acutifolius</i> and <i>P. lunatus</i> using <i>in vitro</i> technique. J. B. Cabral, O. J. Crococo	243
Site index and height growth curves for <i>Pinus oocarpa</i> Schiede in central Honduras. C. T. Stiff, D. N. Perez, F. D. Johnson	247
Soybean root growth and nutrient uptake as affected by lime rates and plant age. II. Ca, Mg, K, Fe, Cu and Zn. J. A. Martini, R. G. Mutters	254
Normas de manipulación y uso del paraquat por los pequeños productores de maíz en Centroamérica. M. J. Whitaker	260
Notas y comentarios	150, 161, 198, 207
Reseña de libros	275, 277



INSTITUTO INTERAMERICANO DE COOPERACION PARA LA AGRICULTURA

San José, Costa Rica

CR ISSN 0041 - 4360

Calibración de los Parámetros de EUF-N, en Relación a los Cultivos de Lechuga y de Veza¹

J. A. Díez*

ABSTRACT

In the present paper, the EUF-N parameters in Spanish soils from the Tagus Valley are calibrated and their optimum levels are established for lettuce and vetch cultures. The high correlation ratio between the parameters of EUF-N_t, EUF-NO₃⁻ and available N compared with the N absorbed by each of the two cultures have made it possible to calculate the optimum level of each for each culture. The values obtained clearly show the differences in each of the cultures in relation to the needs of N. Those of vetch are noticeably lower. In addition, two highly significant ratios were obtained between EUF-N_t and K absorbed by the lettuce and vetch cultures. This shows the interaction of N and K and also that the optimum level of N in the soil directly affects the absorption of K by the plant.

INTRODUCCION

El establecimiento de los requerimientos de fertilizantes nitrogenados con base en los resultados obtenidos en los análisis de suelos, presenta serias dificultades. Esto es debido a que las diferentes formas en que aparece el N en el suelo, pueden sufrir considerables variaciones a lo largo del ciclo de cultivo, con lo cual los análisis de suelo solo permitirían obtener una instantánea en un momento determinado. Por otra parte la información obtenida sería evidentemente incompleta, si solamente se utiliza alguna de las fracciones nitrogenadas, como índice del N asimilable presente en el suelo.

A todo ello se suma, el que mientras unos compuestos nitrogenados como los nitratos son directamente absorbibles por la planta, otros como el amonio o los compuestos orgánicos nitrogenados tienen que ser previamente mineralizados para que puedan ser absorbidos.

En consecuencia Ris *et al.* (8) llegan a la conclusión de que los datos analíticos aislados, acerca del

1 Recibido para publicación el 20 de enero 1988
El autor agradece a la CAICYT, la atención brindada a este proyecto, cuya financiación hizo posible la realización del presente trabajo.

* Instituto de Edafología y Biología, CSIC, Madrid, España.

COMPENDIO

En este trabajo se calibran los parámetros de EUF-N en suelos españoles procedentes del Valle del Tajo, estableciéndose sus niveles óptimos para los cultivos de lechuga y veza. Los elevados coeficientes de correlación obtenidos entre los parámetros EUF-N_t, EUF-NO₃⁻ y N disponible frente al N absorbido por cada uno de ambos cultivos han permitido calcular los niveles óptimos de cada uno de ellos para cada cultivo. Los valores obtenidos muestran claramente las diferencias de cada uno de los cultivos en relación a las necesidades de N, siendo apreciablemente más bajos en la veza. Así mismo, sendas correlaciones altamente significativas han sido obtenidas entre EUF-N_t y el K absorbido por el cultivo de lechuga y de veza, lo que pone de manifiesto la interacción N/K, estableciéndose que el nivel óptimo de N en el suelo, afecta directamente a la absorción de K por la planta.

N mineral del suelo, no facilitan suficiente información para poder dosificar adecuadamente óptimas cantidades de fertilizante nitrogenado a los cultivos.

Muchos y variados han sido los métodos propuestos en los últimos años, basados en la utilización de extractantes químicos, con el fin de evaluar el N mineral presente en el suelo (1, 9) Sin embargo su utilización ha sido en gran parte desechada por los motivos anteriormente apuntados.

En estas circunstancias era necesario desarrollar un método de laboratorio capaz de extraer una fracción medible de NO₃⁻ y al mismo tiempo obtener información acerca del N orgánico fácilmente mineralizable. El método propuesto por Nemeth *et al.* (4) aplicando la electroultrafiltración con este propósito logra a nuestro juicio ambos objetivos.

Sin embargo de nada sirve disponer de metodologías sofisticadas, si los valores que éstas proporcionan no están suficientemente contrastadas, estableciéndose los niveles óptimos de sus parámetros para un determinado tipo de suelo y de cultivo, que sirvan como valores de referencia.

En consecuencia, en el presente trabajo se pretende calibrar los parámetros de EUF-N en suelos es-

pañoles procedentes del Valle del Tajo, estableciendo sus niveles óptimos para los cultivos de lechuga y veza. Al mismo tiempo se prueban las ventajas de integrar varios parámetros, para definir el N disponible del suelo.

MATERIALES Y METODOS

Se llevó a cabo un experimento de invernadero, con 24 muestras de suelo, procedentes de la Vega del Tajo. Algunas de cuyas características fisicoquímicas se muestran en la Cuadro 1. Como puede observarse, si bien los valores de pH son bastante homogéneos, en cambio sus contenidos en materia orgánica y especialmente sus texturas son claramente diferentes en un amplio rango.

En tiestos tipo Mitcherlich conteniendo 8 kg de suelo/tiesto, el primer año se implantó un cultivo de lechuga a razón de una sola planta/tiesto, y el segundo un cultivo de veza a la de 5 plantas/tiesto.

Antes del comienzo del cultivo de lechuga, los suelos fueron convenientemente fertilizados con fósforo y potasio con base en los análisis efectuados por la técnica de electroultrafiltración, de acuerdo al protocolo establecido por Diez *et al.* (2). Así mismo antes de implantar el cultivo de veza se hizo la misma operación.

En las muestras de suelo antes de comenzar cada uno de ambos cultivos se controlaron los niveles de N mediante la técnica de electroultrafiltración (4). Para ello se determinaron los parámetros de EUF-N_t , EUF-NO_3^- y $\text{EUF-N}_{\text{org}}$ siguiendo el siguiente programa de extracción:

Fracción I: 30 min., 20°C, 200 V \leq 15 mA

Fracción II: 5 min., 80°C, 400 V \leq 150 mA

En los extractos de EUF, una vez mezclados los procedentes del cátodo con los del ánodo, se determinó el contenido en N total, siguiendo el método propuesto por Diez (3) basado en la radiación ultravioleta de la muestra y posterior oxidación con persulfato potásico en medio alcalino, en autoanalizador Technicon AAII. Este tratamiento permite transformar todos los compuestos nitrogenados presentes en la muestra en nitrato, el cual es posteriormente valorado en el mismo canal analítico.

Paralelamente, en los mismos extractos se determinó el contenido en nitrato por el método de la N1 naftiletildiamina, sin oxidación previa, cuyos valores tanto de EUF-N_t como de EUF-NO_3^- se muestran en la Cuadro 2. Por diferencia entre el contenido

Cuadro 1. Características físico-químicas de los suelos.

Suelos	pH (H ₂ O)	% Materia Orgánica	% Arcilla
1	7.65	0.94	20
2	7.70	0.84	15
3	7.70	0.96	28
4	7.65	0.88	18
5	7.70	0.92	14
6	7.70	0.99	30
7	7.60	1.10	18
8	7.70	1.10	15
9	7.80	1.46	41
10	7.80	1.42	39
11	7.85	1.58	> 40
12	7.75	1.51	38
13	7.70	1.69	40
14	7.70	1.64	> 40
15	7.70	1.59	38
16	7.80	1.82	30
17	7.70	1.78	35
18	7.65	1.83	> 40
19	7.75	1.89	> 40
20	7.60	1.62	36
21	7.75	1.26	32
22	7.65	1.15	40
23	7.65	1.15	35
24	7.65	1.25	34

de N que presentan ambas fracciones, se determinó una tercera que denominamos $\text{EUF-N}_{\text{org}}$, la cual engloba a los compuestos orgánicos nitrogenados fácilmente mineralizables, de acuerdo a la interpretación dada a dicha fracción por Nemeth *et al.* (4).

El N disponible en el suelo fue evaluado siguiendo la calibración efectuada por Wicklicky *et al.* (10) quienes estiman que cada mg de N en forma de NO_3^- extraído por EUF corresponde a 30 kg de N/ha, y cada mg de N en forma de N orgánico extraído por el mismo procedimiento corresponde a 50 kg de N/ha. La suma de ambos puede considerarse como una aproximación suficientemente contrastada del N disponible para el cultivo.

En cada uno de los cultivos del experimento, una vez recolectados, se determinó la producción de materia seca mediante pesada de la parte aérea de la planta. El N absorbido por la planta se evaluó mediante mineralización sulfonítrica de la misma una vez desecada. Los valores obtenidos se muestran en el Cuadro 3.

RESULTADOS Y DISCUSION

En el Cuadro 1 podemos observar que en general los contenidos en materia orgánica de los suelos están en consonancia con los de arcilla, y también con los de N, sobre los que ejerce una notable influencia, como se muestra en el Cuadro 2.

Puede verse igualmente que los valores de EUF-N detectados antes del cultivo de lechuga, son considerablemente superiores a los mostrados por los suelos antes de comenzar el cultivo de veza. Esto se debe a que el primero origina un apreciable descenso de N como consecuencia de la absorción, que no es resuelta mediante la fertilización, debido a las bajas exigencias previsibles del cultivo siguiente, al tratarse de una leguminosa.

De todo el N extraído de los suelos mediante la técnica de EUF, aproximadamente el 80% se encuentra en forma de NO_3^- y el resto lo hace fundamentalmente en forma de N orgánico fácilmente mineralizable, constituido por compuestos nitrogenados de bajo peso molecular, entre los cuales se engloba una pequeña proporción de formas amónicas.

Por otra parte, como se aprecia en el Cuadro 2, el procedimiento de EUF solamente es capaz de extraer un 10% aproximadamente de todo el N detectado en el suelo mediante el método Kjeldahl. El N extraído por EUF como ha sido demostrado por Nemeth *et al.* (4) corresponde principalmente al que previsiblemente participará en la nutrición del cultivo siguiente, es decir el N asimilable. Sin embargo, considerando que no todos los compuestos nitrogenados presentan la misma facilidad para ser asimilados por las plantas, en un estudio realizado por Wicklicky *et al.* (10) se ha dado un determinado peso específico a cada una de las formas de N detectadas, a partir de cuyo cálculo es posible determinar el contenido en N disponible, tal como se comentó anteriormente.

En cuanto al N absorbido por cada uno de ambos cultivos (Cuadro 3) podemos observar que los suelos con contenidos en materia orgánica más elevada y por tanto en N, son los que presentan mayores niveles de absorción de este elemento. Por otra parte, en dicho cuadro se muestra que el cultivo de veza, a pesar de los bajos niveles de N detectados en el suelo antes del comienzo de éste, la absorción de N supera en general, a la del cultivo de lechuga. Esto pone de manifiesto la capacidad de la veza para fijar N atmosférico en proporciones altamente significativas.

El sistema más frecuentemente utilizado para la calibración de la información obtenida sobre un elemento por un determinado método, se basa en la correlación entre el parámetro de N que deseamos valorar frente al N absorbido por la planta, o bien frente a la producción de materia seca o de producto útil (grano, hoja, etc.). Este procedimiento permite establecer los niveles óptimos de los parámetros de N necesarios para conseguir el máximo de absorción nitrogenada por la planta, siempre que se consiga obtener una regresión parabólica que relacione ambas series

Cuadro 2. Parámetros de EUF-N de los suelos, cuyas muestras fueron tomadas: 1 antes del cultivo de lechuga; 2 antes del cultivo de veza (mg N/100 g suelo).

Suelos	EUF-N _t		EUF-NO ₃ ⁻		N kjeldahl	
	1	2	1	2	1	2
1	5.4	1.9	4.1	0.8	65	39
2	4.6	0.8	4.0	0.7	65	41
3	5.3	1.1	4.6	0.8	66	43
4	6.4	1.4	4.9	1.3	57	45
5	5.0	0.6	4.1	0.7	68	55
6	5.4	1.3	4.4	1.2	73	49
7	7.1	1.3	6.0	1.3	62	52
8	5.4	0.9	4.1	0.9	67	46
9	11.3	1.2	4.2	1.3	100	73
10	11.3	2.3	8.1	3.0	110	73
11	11.5	1.2	9.8	0.8	112	98
12	10.5	1.3	9.3	1.0	112	99
13	10.1	1.1	9.1	1.0	95	102
14	10.1	1.6	5.9	1.4	96	105
15	12.5	2.9	11.4	2.9	108	108
16	11.7	2.0	9.5	1.7	114	106
17	11.1	1.9	9.6	1.9	110	111
18	11.4	2.6	9.8	2.5	116	111
19	10.8	2.5	9.7	2.5	119	109
20	11.9	2.5	10.7	2.5	133	122
21	9.5	1.2	9.1	1.0	128	126
22	10.1	1.7	9.4	2.1	128	122
23	11.3	3.4	10.5	2.9	120	131
24	10.5	3.0	9.7	2.8	132	132

de valores, y cuyo coeficiente de correlación tenga una elevada significación, circunstancias que se dan en el presente experimento.

En este sentido en el Cuadro 4 puede apreciarse que al relacionar el N absorbido por el cultivo de lechuga frente a los diferentes parámetros de N, se obtuvieron correlaciones significativas en todos los casos a excepción de EUF-N_{org}. Las mismas correlaciones significativas fueron obtenidas al relacionar estos parámetros frente a la producción de materia seca.

Así mismo con el cultivo de veza, se obtuvieron resultados análogos a los mostrados para el cultivo de lechuga (ver Cuadro 5), los cuales son coincidentes con los obtenidos por Nemeth *et al.* (5) en suelos parrandina y aluviales.

Debe destacarse, que si bien el EUF-N_{org} no dio elevadas correlaciones en ninguno de los casos, frente a la absorción de N o a la producción de materia seca; sin embargo, cuando este parámetro se integra dentro del N disponible con su correspondiente peso específico, correlaciona significativamente, lo que es indicativo de que esta fracción nitrogenada interviene activamente en la nutrición. Nemeth *et al.* (5) han halla-

Cuadro 3. Valores de N absorbido y producción de materia seca correspondientes a los cultivos de lechuga y veza.

Suelos	N absorbido (mg N/tiempo)		Producción de materia seca (g N/tiempo)	
	Lechuga	Veza	Lechuga	Veza
1	278	397	10.3	12.4
2	402	423	11.6	10.5
3	351	463	11.9	12.6
4	347	443	9.9	13.4
5	291	355	9.6	10.3
6	413	432	11.7	13.4
7	437	533	13.0	16.8
8	391	455	12.7	13.0
9	520	651	15.3	18.9
10	542	593	13.2	19.0
11	538	639	17.3	18.3
12	562	623	15.6	17.8
13	551	527	16.3	16.6
14	629	569	16.1	18.2
15	578	527	15.5	17.9
16	539	607	16.2	18.5
17	586	629	15.5	19.0
18	686	622	15.7	18.0
19	583	666	14.2	18.4
20	648	694	15.3	19.6
21	655	664	17.8	19.1
22	697	689	16.8	20.7
23	671	634	16.0	19.7
24	601	660	15.2	19.0

do una correlación significativa entre $EUF-N_{org}$ y la producción de paja en el cultivo de trigo.

De los resultados obtenidos puede deducirse que $EUF-N_t$, $EUF-NO_3$ y N disponible, constituyen excelentes parámetros para medir la disponibilidad de N para la planta en este tipo de suelos. Sin embargo, desde un punto de vista más amplio, teniendo en

cuenta su aplicabilidad a otro tipo de suelos parece recomendable la utilización del parámetro de N disponible propuesto por Wicklicky *et al.* (10) debido a que integra en su cálculo el contenido en nitrato presente en el suelo por una parte y el N orgánico fácilmente mineralizable por otra. Al propio tiempo, permite realizar un balance del N en el suelo basado en la exportación previsible de N por el cultivo, y el N que el suelo puede aportar al mismo, de donde puede deducirse la dosificación de fertilizante nitrogenado más adecuada.

El hecho de que el N Kjeldahl correlacione significativamente con el N absorbido al igual que ocurre con los parámetros de $EUF-N$, significa que en los suelos del experimento existe una proporcionalidad entre el N total presente en el suelo y el extraído por EUF . Sin embargo este resultado no debería generalizarse, ya que como ha sido observado por Nemeth *et al.* (4) en los suelos de Yugoslavia utilizados en su trabajo, no obtuvieron correlaciones significativas entre el contenido de N Kjeldahl y $EUF-N$. Esta proporcionalidad puede darse siempre que los suelos utilizados presenten una dinámica del N homogénea, la cual puede evaluarse a través de la relación $EUF-NO_3/EUF-N_{org}$, que en el caso de los suelos del experimento oscila entre 1 y 22. Estos valores elevados indican que no es previsible una inmovilización del N ante una hipotética fertilización, y que el comportamiento de los suelos respecto a la dinámica del N es bastante homogéneo.

Por lo que respecta a la calibración de los parámetros de N con base en el planteamiento anteriormente apuntado en la Fig 1, se muestra a modo de ejemplo la determinación del nivel óptimo del parámetro de $EUF-N_t$ para la nutrición nitrogenada del cultivo de lechuga. En ella puede observarse que en la curva de regresión parabólica obtenida al relacionar $EUF-N_t$ frente al N absorbido por el cultivo de lechuga, vemos que el nivel máximo de absorción de N

Cuadro 4. Ecuaciones de regresión parabólica y coeficientes de correlación, entre el N absorbido por el cultivo de lechuga y la producción de materia seca, frente a los parámetros de $EUF-N$ y N Kjeldahl.

X	Y N absorbido		Y Producción de materia seca	
	R	Ec. regresión	R	Ec. regresión
$EUF-N_t$	0.873***	$Y = -244.7 + 147.6x - 6.46x^2$	0.855***	$Y = -0.6 + 2.92x - 0.13x^2$
$EUF-NO_3$	0.839***	$Y = -28.0 + 119.3x - 5.54x^2$	0.792***	$Y = 3.49 + 2.45x - 0.12x^2$
$EUF-N_{org}$	0.243		0.239	
N disponible	0.856***	$Y = 272.3 + 4.7x - 0.006x^2$	0.843***	$Y = 3.25 + 0.057x - 0.00006x^2$
N Kjeldahl	0.909***	$Y = 119.2 + 9.0x - 0.024x^2$	0.868***	$Y = 4.13 + 0.32x - 0.0013x^2$

*** Nivel de significación 0.1%.

Cuadro 5. Ecuaciones de regresión parabólica y coeficientes de correlación entre el N absorbido por el cultivo de veza y la producción de materia seca, frente a los parámetros de EUF-N y N Kjeldahl.

X	Y N absorbido		Y Producción de materia seca	
	R	Ec. regresión	R	Ec. regresión
EUF-N _t	0.586**	Y= 272.0 + 275.8x - 52.88x ²	0.680***	Y= 6.4 + 9.7x - 1.86x ²
EUF-NO ₃ ⁻	0.676***	Y= 217.3 + 385.4x - 86.02x ²	0.757***	Y= 5.4 + 12.4x - 2.72x ²
EUF-N _{org}	0.397		0.333	
N disponible	0.525*	Y= 300.6 + 7.8x - 0.048x ²	0.616**	Y= 7.9 + 0.26x - 0.0015x ²
N kjeldahl	0.858***	Y= 218.5 + 5.8x - 0.019x ²	0.881***	Y= 4.1 + 0.24x - 0.00094x ²

*, **, *** niveles de significación al 5, 1 y 0.1% respectivamente

corresponde a un valor de EUF-N_t del 11.43 mg N/100 g, siendo el coeficiente de correlación significativo a nivel 0.1% (R = 0.873). Sin embargo si nos referimos a la zona de máxima pendiente de la curva que a su vez corresponde a la de mejor aprovechamiento del N del suelo, este valor quedaría reducido a 9.4 mg N/100 g con una pérdida estimada sobre el máximo de absorción del 5%

Este razonamiento significa, que para un cultivo de lechuga en suelos de características análogos a los del experimento, para obtener un máximo de absorción nitrogenada, se establece como nivel óptimo de EUF-N_t el de 9.4 mg N/100 g de suelo

Seguindo este mismo procedimiento, han sido calculados los niveles óptimos de los parámetros de EUF-N_t, EUF-NO₃⁻ y N disponible para los cultivos de lechuga y veza, cuyos valores se presentan en el Cuadro 6

Estos valores son claramente diferentes cuando se trata del cultivo de lechuga comparado con el de veza, siendo lógicamente más elevados en el primer caso. Observamos que para el cultivo de lechuga el nivel

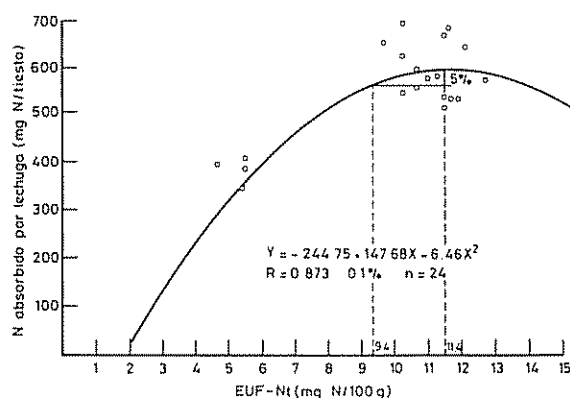


Fig. 1. Representación gráfica de la ecuación parabólica que relaciona EUF-N_t (fracciones I + II) con el N absorbido por el cultivo de lechuga. Determinación del nivel óptimo

óptimo de EUF-N_t se estima en 9.40 mg N/100 g y el de EUF-NO₃⁻ en 8.73 mg N/100 g, lo cual demuestra claramente que el nitrato en este tipo de suelos constituye la fuente más importante de N para este cultivo. El nivel óptimo calculado del N disponible para este cultivo fue de 310 kg N/ha

Sin embargo en el cultivo de veza, los valores exigidos para conseguir una óptima nutrición nitrogenada son considerablemente más bajos, 1.90 mg N/100 g para EUF-N_t y 1.61 mg N/100 g para EUF-NO₃⁻. Esta acusada diferencia con respecto al cultivo anterior, se explica por el importante componente que tienen en la nutrición de las leguminosas, la fijación simbiótica de N

Los niveles anteriormente apuntados, pueden ser orientativos para valorar la capacidad nutricional nitrogenada de los suelos y en consecuencia, la utilización de cualquiera de estos parámetros podría servir de base para establecer la fertilización nitrogenada. Sin embargo, a este respecto, somos partidarios de realizar un balance entre entradas y salidas del N de suelo, empleando en este caso el parámetro de N disponible para evaluar el contenido en N que el suelo es capaz de suministrar al cultivo, para finalmente calcular con mayor precisión las necesidades de fertilizante nitrogenado

Por otra parte, en el estudio realizado a través de este experimento se ha podido comprobar la posible interacción N/K, dada la íntima relación existente entre el nivel de N presente en el suelo y el K absorbido para cada uno de ambos cultivos. Efectivamente, sendas correlaciones altamente significativas han sido obtenidas entre EUF-N_t y el K absorbido por el cultivo de lechuga (R = 0.861***) y de veza (R = 0.652***), lo cual confirma la tesis sobre la interacción N/K observada por Nemeth *et al.* (5) en relación a la nutrición de cereales, en cuyo trabajo demuestran que el nivel de N en el suelo incide directamente sobre la absorción de K por la planta, lo cual

Cuadro 6. Valores de $EU\bar{F}-N_t$, $EU\bar{F}-NO_3^-$ y N disponible que corresponden a la máxima absorción de N por los cultivos de lechuga y veza, y los calculados como nivel óptimo por cada uno de ellos.

Parámetros	Lechuga		Veza	
	Absorción máxima de N	Nivel óptimo	Absorción máxima de N	Nivel óptimo*
$EU\bar{F}-N_t$ (mg N/100 g)	11.43	9.40	2.64	1.90
$EU\bar{F}-NO_3^-$ (mg N/100 g)	10.77	8.73	2.24	1.61
N disponible (kg N/ha)	370.00	310.00	—	—

* Pérdida sobre el máximo de absorción de N del 5%

puede afectar positivamente a la producción cuando ambos nutrimentos se encuentran en cantidades suficientes y equilibradas en el suelo

Paralelamente, se ha podido observar a través del punto máximo de las curvas de regresión, que existe un paralelismo entre el $EU\bar{F}-N_t$ que corresponde con la máxima absorción de N en el cultivo de lechuga (11.43 mg N/100 g), y el que lo hace con la máxima absorción de K (10.88 mg N/100 g). Esto parece indicar que los niveles óptimos anteriormente establecidos afectan no solo a la nutrición nitrogenada sino también a la potásica

Como conclusión puede establecerse, que los elevados coeficientes de correlación obtenidos entre los parámetros de $EU\bar{F}-N$ y el N absorbido, han permitido calcular los niveles óptimos de cada uno de ellos, para el cultivo de lechuga y de veza. Los valores obtenidos muestran claramente las diferencias de cada cultivo en relación a las necesidades de nitrógeno.

Así mismo, se pone de manifiesto la interacción N/K, estableciéndose que el nivel óptimo de N afecta directamente a la absorción de K, tanto en el cultivo de lechuga como en el de veza

LITERATURA CITADA

1. COTTE, J., KEHANA, E. 1946. Sur une nouvelle méthode de la réduction pour le dosage des nitrates. *Bull. Soc. Chem. Fr.* 542:554.
2. DIEZ, J.A.; CADAHIA, C.; GARATE, A.; REVILLA, E. 1985. Estudio de la dinámica de nutrientes mediante electro-ultrafiltración como base de la fertilización. *Inst. de Edafología y Biología Vegetal, CSIC, Depto. Química Agrícola U.A.M., Ed. Malquisa.*
3. DIEZ, J.A. 1985. Determinación de N U.V. oxidable y de nitrato en extractos de suelos mediante autoanalizador. *Anal. Edafol. Agrobiol.* 44:1 453-1 464.
4. NEMEIH, K.; MAKHDUM, I.Q.; KOCH, K.; BERINGER, H. 1979. Determination of categories of soil nitrogen by electro-ultrafiltration (EU\bar{F}). *Plant Soil* 53:445-453.
5. NEMEIH, K. 1984. Response of grain yield of wheat to potassium as a function of nitrogen dynamics in the soil. *18th Coll. Int. Potash Inst. Proc. (Gardone, Italy)* 175-183.
6. NEMETH, K.; FURSTENFELD, F. 1985. Changes of $EU\bar{F}-N$ and $EU\bar{F}-K$ fractions in three deep grey-brown luvisols during 18 months under fallow. *Plant Soil* 86:249-256.
7. NEMEIH, K. 1985. Recent advances in $EU\bar{F}$ -research (1980-1983). *Plant Soil* 83:1-19.
8. RIS, I.; SMILDE, K.W.; WIJNEM, G. 1981. Nitrogen fertilizer recommendations for arable crops as based on soil analysis. *Fertilizer Research* 2:21-32.
9. ROMERO, R.; LLORENS, J.; PUCHADES, R.; PRIMO, E. 1985. Variabilidad de los resultados de la determinación de N asimilable en suelos citrícolas. Influencia de la toma y preparación de las muestras. *Agrochimica* 27:397-405.
10. WICKLICKY, L.; NEMETH, K. 1981. Dungungsoptimierung mittels $EU\bar{F}$ Bodenuntersuchung bei der Zuckerrube. *Sonderdruck aus Band 106:982-988.*

Comparative Attractiveness of Floral Fragrance Oils of "RIM" and "Catongo" Cultivars of Cacao (*Theobroma cacao* L.) to Diptera in a Costa Rican Cacao Plantation¹

A. M. Young*

ABSTRACT

Three serial dilutions (100 ppm, 10 ppm, 1 ppm), each replicated three times, of steam-distilled, chloroform-extracted floral fragrance oils of two distinctive self-compatible cultivars, RIM-100 and Catongo, of *Theobroma cacao* Linnaeus (Sterculiaceae), or "cacao", were used in McPhail traps in an abandoned Costa Rican cacao (Matina) plantation during the rainy season, to determine comparative levels of attractiveness to small-bodied Diptera, especially potentially cacao-pollinating midges. Chloroform-distilled water solution was used to inoculate six control traps. All 24 traps were suspended in trees (mostly cacao) only weakly flowering and censused daily for six successive days to determine insects attracted to the floral oil inoculations. Floral oils were refreshed on the third day of the bioassay. Although Cecidomyiidae, especially *Aphidodiplosis triangularis* (Felt) and to a lesser extent, *Mycodiplosis ligulata* Gagné, were more than ten times as abundant (for a total of 11 species) than Ceratopogonidae, representative species of the latter group, especially *Dasyhelea* sp. 1, *grisea* group, indicate that steam-distilled floral oils of both cultivars attract potential pollinating agents of cacao. Females of suspected pollinators, *M. ligulata* and *D. sp. 1*, *grisea* group, dominated the samples, consistent with similar sex ratio patterns observed in cacao flowers for these species. Several other families of Diptera, including the Phoridae known to pollinate the allied genus *Herrania* in Costa Rica, were each represented by one or a few individuals. Diptera, with one exception, were absent from the control traps. Collectively the data indicate that the floral fragrance oils of both cultivars of cacao examined actively attract Diptera, including groups containing known natural pollinating agents of *T. cacao*. Further study is required to determine the degree of chemical similarity (for volatile substances) in the fragrance oils between these two cacao cultivars, which in turn may help to explain the observed patterns in field bioassays.

¹ Received for publication 13 November 1988.

This research was funded by grants from The American Cocoa Research Institute of The Chocolate Manufacturers Association of the United States of America. I thank B. K. Matlick, Gordon R. Patterson, and Drs. R. Applebaum, R. Hunter, and L. H. Purdy for encouragement. My special thanks to Drs. Barbara and Eric Erickson for collaborative assistance with floral oils and insect biology. I also thank Drs. S. W. Peterson, F. C. Thompson, R. Ward (Walter Reed Biosystematics Unit), and especially Drs. Raymond J. Gagné and Willis W. Wirth, all of the Systematic Entomology Laboratory (U.S. Dept. of Agriculture) at the U.S. National Museum (Washington, D.C.) and the staff at the Biosystematics and Beneficial Insects Institute (U.S.D.A., Agricultural Research Service) in Beltsville, Maryland, for the taxonomic determinations of the insects. The staff of the Cacao Program at C.A.T.I.E., especially Drs. Gustavo Enriquez and Jose Galindo, and Ricardo Palacios, provided much appreciated cooperation with conducting this research at the La Lola experimental farm.

COMPENDIO

En un terreno de cacao "Matina" abandonado de Costa Rica se hicieron pruebas durante la temporada de lluvias para comparar la atracción de tres concentraciones progresivas (100 ppm, 10 ppm, 1 ppm) de las esencias de las flores de *Theobroma cacao* Linnaeus (Sterculiaceae) para los dípteros pequeños, especialmente los que puedan efectuar la polinización del cacao. Las esencias que se usaron en trampas McPhail fueron de los clones autocompatibles de cacao RIM-100 y Catongo. Estas esencias se extraen con destilación a base de cloroformo. El experimento se repitió tres veces. En seis trampas testigo se colocó agua destilada y cloroformo. Las veinticuatro trampas se colocaron en las ramas de árboles, especialmente de cacao con pocas flores. Se censaron las trampas por seis días sucesivos para determinar cuales insectos experimentaban la atracción a las esencias de las flores. El tercer día del experimento se renovaron las esencias. Los insectos que predominaron fueron los Cecidomyiidae, especialmente *Aphidodiplosis triangularis* (Felt) pero también se contaron *Mycodiplosis ligulata* Gagné. Las 11 especies de esta familia abundaron diez veces más que los Ceratopogonidae. Sin embargo entre las varias especies de Ceratopogonidae abundaron las *Dasyhelea* sp. 1, grupo *grisea* y su presencia indica la atracción a las esencias destiladas de las flores de los dos clones de cacao para los dípteros que pueden efectuar la polinización. Las hembras de *M. ligulata* y *D. sp. 1*, grupo *grisea* predominaron en las muestras y se cree que estos son algunos de las especies que efectúan la polinización del cacao. La proporción de números de hembras a machos de estas especies en las trampas corresponde a las proporciones de estos dípteros en las flores del cacao. También en las trampas se encontraron un solo individuo o unos pocos individuos de varias otras familias de los Díptera e incluso los Phoridae que se sabe que efectúan la polinización de *Herrania* en Costa Rica. *Herrania* es un género de la misma familia que el cacao. No se encontraron sino una sola especie de dípteros en las trampas testigo. En suma los datos indican que las esencias de las flores de los dos clones de cacao RIM-100 y Catongo atraen los Díptera e incluso los grupos de dípteros que se sabe que efectúan la polinización de *T. cacao*. Sin embargo se necesitarán análisis precisos para determinar las propiedades en común de las sustancias volátiles en las esencias de las flores de estos dos clones de cacao. Los resultados de este análisis explicarán las observaciones realizadas en este experimento y en otros.

INTRODUCTION

Steam-distilled floral fragrance oils from freshly open flowers of *Theobroma* species, including *T. cacao* Linnaeus (Sterculiaceae), "cacao," are chemically complex in terms of volatile substances (4) and have been shown to attract a range of small-

* Invertebrate Zoology Section, Milwaukee Public Museum, 800 West Wells Street, Milwaukee, Wisconsin 53233, USA.

bodied Diptera in Costa Rica (20). Given the generally accepted view that some Ceratopogonidae (Diptera), especially species of *Forcipomyia* and allied genera, are the most important pollinators of cacao in commercial plantations (1, 5, 7, 8, 9) and the intense floral visitation by Cecidomyiidae, the role of floral oils as effective attractants for pollinating insects deserves further study. This paper reports on the attraction of Diptera, principally Cecidomyiidae and Ceratopogonidae, to steam-distilled floral oils of two cultivated varieties of *T. cacao* in a Costa Rican cacao plantation. Since different cultivars of *T. cacao* vary greatly in the yields of cacao beans (2, 3), observed differences in levels of attractiveness of floral oils from different cultivars to potential pollinating insects may contribute to our overall understanding of how natural pollination affects commercial yield.

MATERIALS AND METHODS

From 30 June through 6 July 1987, the attraction of flying insects to serial dilutions of steam-distilled floral fragrance oils were bioassayed of the "Catongo" and "RIM-100" cultivars of *T. cacao* in an abandoned plantation of "Matina" cacao (Fig. 1) bordering the La Lola experimental farm, near Siquirres (10°06'N; 83°20'W; elev. approx. 50 m), Limon Province, Costa Rica. As with previous bioassays of *Theobroma* floral fragrances at this locality (20), 18 randomly-distrib-



Fig. 1. Above: The abandoned "Matina" cacao plantation bordering La Lola experimental farm in Costa Rica, where the bioassay of cacao floral fragrances oils was conducted during July 1987. Below: One of 24 McPhail traps used for bioassaying floral oils in the field.

uted experimental and six control McPhail traps (Fig. 1) were used in the present study. The experimental design consisted of testing two cacao cultivars with three serial dilutions (100 ppm of fragrance oil extracted in chloroform and mixed with distilled water, 10 ppm and 1 ppm) and three replicates of each, in addition to the six control traps (10% solution of chloroform and distilled water). 20 of the 24 trees used for suspending traps (1.0-1.5 m above the ground) were cacao, and a census was made of the abundance of flowers on these trees during the study. All traps were filled with approximately 3 cm of distilled water mixed with soap to trap insects. Traps were individually emptied each morning (usually 08:00-10:00) by pouring the water through coffee filter paper on a strainer. All insects were collected into vials of alcohol for sorting. On the morning of the third day, i.e., half-way through the bioassay, the traps were re-inoculated with fresh floral oils (experimentals) or chloroform-distilled water (controls). Voucher specimens were later identified and sorted further for taxonomic identification by entomologists at the U.S. National Museum.

The bioassay was conducted in the rainy season but during a week of fairly dry, sunny weather with intermittent showers. Based upon comparative morphological studies of flowers belonging to different cultivars of cacao underway at the present time and previously noted information, it was decided to compare the attractiveness of Catongo, a Forastero-derived cultivar characterized by comparatively average floral size, and unpigmented peduncle, sepals, ligules and staminoids, with RIM-100, a Criollo-derived, strongly pigmented (reddish) floral type, noted for its uniquely large size. Both cultivars are reported to be self-compatible (2, 3). Although analyses of the floral fragrance oils from these cultivars are incomplete, given the observations of very significant differences in floral structures related to natural pollination between these cultivars, it was suspected that the bioassays would reveal differences in the numbers and kinds of Diptera attracted in the field.

RESULTS AND DISCUSSION

The RIM cultivar floral fragrance oil attracted about twice the number of species of Cecidomyiidae as Catongo, although one species, *Aphidodiplosis triangularis* (Felt), comprised about 70% and 88% of the total samples for each floral oil, respectively (Table 1). For all cecidomyiids, the 100 ppm concentration of RIM floral oil attracted the greatest quantity of midges, whereas the 10 ppm-inoculated traps of Catongo attracted the greatest number of midges for that cultivar (Table 1). Only two individuals (*A.*

Table 1. Attraction* of Cecidomyiidae (Diptera) to replicated serial dilutions of steam-distilled floral oils from two distinct cultivars (clones), "RIM" and "Catongo," of *Theobroma cacao* Linnaeus (Sterculiaceae) during a rainy season bioassay in an abandoned cacao plantation in Costa Rica.

Species	Total numbers of midges in traps:**			Total	Sex ratio (F:M)
	100 ppm	10 ppm	1 ppm		
"RIM cultivar"					
<i>Aphidodiplosis triangularis</i> (Felt)	38	6	22	66	30:36
<i>Mycodiplosis ligulata</i> Gagné	7	0	0	7	6:1
<i>Ledomysia</i> sp. 1	3	3	2	8	6:2
<i>Coquillettomyia</i> sp.	1	0	0	1	0:1
<i>Trisopsis</i> sp.	0	0	1	1	1:0
Cecidomyiidi sp. 1	0	2	0	2	2:0
Cecidomyiidi sp. 2	2	2	1	5	4:1
Cecidomyiidi sp. 3	0	0	2	2	1:1
Cecidomyiidi sp. 4	0	0	1	1	1:0
Cecidomyiidi sp. 5	0	0	1	1	1:0
Cecidomyiidi sp. 6	0	1	0	1	1:0
Total midges	51	14	30	95	53:42
% <i>A. triangularis</i>	69.47%				
"Catongo cultivar"					
<i>Aphidodiplosis triangularis</i> (Felt)	22	33	17	72	27:45
<i>Mycodiplosis ligulata</i> Gagné	0	1	0	1	1:0
<i>Ledomysia</i> sp. 1	1	1	0	2	1:1
<i>Ledomysia</i> sp. 2	0	2	0	2	0:2
<i>Bremia</i> sp.	0	1	0	1	1:0
Cecidomyiidi sp. 1	1	3	0	4	4:0
Total midges:	24	41	17	82	34:48
% <i>A. triangularis</i>	87.80%				
Controls ("blanks")					
<i>Aphidodiplosis triangularis</i> (Felt)	—	—	—	2	1:1

* Data summed for 24 McPhail traps, consisting of 18 "experimentals" and six "controls" (chloroform-distilled water blanks), for six successive days, with experimental traps re-inoculated with fresh floral oil distillate, and controls accordingly, on the third day of census.

** Total of three replicates for each experimental treatment for each cultivar tested.

triangularis) were found in the floral oil-free control traps (Table 1). Males of *A. triangularis*, the most abundant cecidomyiid species in samples of both cultivars, were more abundant than females, although only slightly so for RIM floral oil (Table 1). But for two of the next most abundant species found in the RIM samples, *Mycodiplosis ligulata* Gagné and *Ledomysia* sp., females were more numerous, even though the number of individuals was very low (Table 1). For all floral oil concentrations studied, both cultivars were fairly well matched in terms of the total number of cecidomyiid midges attracted (Table 1).

Several species of Ceratopogonidae were attracted to floral fragrance oils of both cultivars, with the most abundant species, albeit a very small sample size (representing about 57% of the sample), being *Dasyhelea* sp. 1, *grisea* group appearing in RIM-inoculated traps (Table 2). Interestingly, three species of *Forcipomyia* were attracted to the floral oils tested. The most abundant ceratopogonid, *D.* sp. 1, *grisea* group, was represented only by females (Table 2). Several

other families of Diptera, including the Phoridae, were represented by various species attracted to both kinds of floral fragrance oils, and none were found in the control traps (Table 3). For virtually all groups of Diptera found, attraction of floral oils was fairly spread out across different levels of concentration (Tables 1-3). Additionally, one individual of the stingless bee *Trigona amalthea* (Oliv.) (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae) was found in the 100 ppm of Catongo floral fragrance oil.

Compared to other times of the year, floral abundance on the twenty cacao trees with traps was low. With a range of 0-213 flowers per tree and six trees with no flowers, the average ($X \pm S.E.$) number of flowers was 52.21 ± 15.77 during the study.

Although overall Cecidomyiidae were more than ten times as abundant as Ceratopogonidae collectively in all floral oil-inoculated McPhail traps in this study, ceratopogonids, especially *Forcipomyia* species, are considered to be the principal pollinating agents of

Table 2. Attraction* of Ceratopogonidae (Diptera) to replicated serial dilutions of steam-distilled floral oils from two distinct cultivars (clones), "RIM" and "Catongo," of *Theobroma cacao* Linnaeus (Sterculiaceae) during a rainy season bioassay in an abandoned cacao plantation in Costa Rica.

Species	Total numbers of midges in traps:**			Total	Sex ratio (F:M)
	100 ppm	10 ppm	1 ppm		
"RIM cultivar"					
<i>Forcipomyia genualis</i> (Loew)	0	1	0	1	0:1
<i>F. harpegonata</i> Wirth & Soria	0	1	0	1	0:1
<i>Forcipomyia</i> sp	0	1	0	1	0:1
<i>Dasyhelea</i> sp 1, <i>grisea</i> group	1	3	3	7	7:0
Total midges:	1	6	3	10	7:3
"Catongo cultivar"					
<i>Forcipomyia genualis</i> (Loew)	1	1	0	2	0:2
<i>Dasyhelea</i> sp 1, <i>grisea</i> group	1	0	0	1	1:0
<i>Atrichopogon</i> sp	0	0	1	1	0:1
Total midges:	2	1	1	4	1:3

* Data summed for 24 McPhail traps, consisting of 18 "experimentals" and six "controls" (chloroform-distilled water blanks), for six successive days, with experimental traps re-inoculated with fresh oil distillate, and control accordingly, on the third day of census

** Total of three replicates for each experimental treatment for each cultivar tested

cacao flowers (12). The exact role of cecidomyiids as major pollinators of cacao remains to be determined, although certain species may be effective pollinators (6). In Costa Rica, *Mycodiplosis ligulata* Gagné is a likely pollinator of cacao flowers (17), and several of the genera and species attracted to cacao flower fragrance oils in the present study, including *Aphidodiplosis triangularis* (Felt), routinely visit cacao flowers in Costa Rica. However, other reports indicate that cecidomyiids may not be pollinating agents of cacao (9). An outstanding feature of the data, also found in a previous study (20), are the very small numbers of insects trapped in these bioassays. It is believed that these abundance patterns of cacao-associated adult Diptera reflect actual population densities of these insects in cacao habitats. Given the observed low abundance of cacao flowers in the study area during the bioassay, it is unlikely that midges were more attracted to flowers than fragrance oils in the traps.

The highly skewed ratio of both *M. ligulata* (Cecidomyiidae) and *Dasyhelea* sp. 1, *grisea* group (Ceratopogonidae) in favor of females observed in the traps, is consistent with direct observations of these species in cacao flowers (15, 17). Female ceratopogonid midges are considered to be the chief pollinating agents of cacao (1) and female cecidomyiids may also pollinate cacao flowers more than males. *Dasyhelea* species are routinely found in cacao flowers in Brazil and elsewhere in the New World tropics (10) and the apparent close association of these midges with the

culturing of cacao warrants further examination (9, 13). Hernandez (5) reported that *Dasyhelea* midges pollinate cacao flowers in Costa Rica. The observed attraction of ceratopogonids and cecidomyiids to steam-distilled floral fragrance oils of cacao (20) demonstrates that cacao flowers emit fragrant volatiles attractive to natural pollinating agents, although other floral cues are most certainly involved in the pollinator association with cacao flowers (19). Since we have used distilled oils in the bioassays (20); (present study), undoubtedly our inoculates include those volatiles emitted from cacao flowers.

The observed attraction of several other families of Diptera, and the general absence of other insect groups, further suggests a floral-pollinator syndrome adaptive to Diptera. Although stingless bees regularly visit cacao flowers in the Neotropics, they are not considered to be pollinators of cacao (14). Of particular interest is the attraction of phorids, such as *Megaselia* sp., known pollinators or *Herrania* (16), a genus closely related to *Theobroma*. Phorids have been captured in the immediate vicinity of cacao flowers in Costa Rica (18).

Soria, Silva and Chapman (11), examining several different cultivars of cacao including the nonpigmented Catongo, concluded that floral pigmentation did not influence rates of natural pollination by *Forcipomyia* midges in Costa Rica. The results of the present study indirectly confirm this conclusion since no major differences in the levels of attraction between

Table 3. Attraction* of Diptera, various families, to replicated serial dilutions of steam-distilled floral oils from two distinct cultivars (clones), "RIM" and "Catongo," of *Theobroma cacao* Linnaeus (Sterculiaceae) during a rainy season bioassay in an abandoned cacao plantation in Costa Rica.

Species	Total numbers of midges in traps:**			
	100 ppm	10 ppm	1 ppm	Total
"RIM cultivar"				
Sciaridae				
<i>Bradysia</i> sp. <i>coprophila</i> group	0	1	0	1
Phoridae, undet. genus & species	1	0	0	1
Chironomidae				
Orthocladinae	0	0	1	1
Psychodidae, undet. genus & species	2	0	0	2
Empididae, undet. genus & species	1	1	0	2
Culicidae				
prob. <i>Culex</i> sp.	0	0	2	2
<i>Aedes</i> sp.	0	0	1	1
<i>Trichoprosopon</i> sp.	1	0	0	1
undet. genus and species	1	1	2	4
Total dipterans:	6	3	6	15
"Catongo cultivar"				
Sciaridae				
<i>Bradysia</i> sp. <i>coprophila</i> group	2	0	1	3
Phoridae				
<i>Megaselia</i> sp.	2	0	0	2
undet. genus & species	0	1	1	2
Psychodidae, undet. genus & species	1	0	0	1
Empididae, undet. genus & species	0	0	1	1
Culicidae				
prob. <i>Culex</i> sp.	0	0	1	1
Total dipterans:	5	1	4	10

* Data summed for 24 McPhail traps, consisting of 18 "experimentals" and six "controls" (chloroform-distilled water blanks), for six successive days, with experimental traps re-inoculated with fresh floral oil distillate, and controls accordingly, on the third day of census

** Total of three replicates for each cultivar tested

floral fragrance oils of two very distinctive cacao cultivators, including Catongo, for both Ceratopogonidae and Cecidomyiidae, were found in the bioassay. Of interest, however, was the observed greater taxo-

nomic diversity of Cecidomyiidae attracted to RIM floral oil. Further understanding of these observations awaits the analyses of floral oil differences among cacao cultivars and a clearer understanding of the genetic derivations of cacao cultivars.

LITERATURE CITED

1. BILLES, D. J. 1941. Pollination of *Theobroma cacao* L. in Trinidad. B. W. I. Tropical Agricultural (Trinidad) 18:151-156
2. ENRIQUEZ, G. A. 1981. Cacao International Catalog. Turrialba, C.R. CATIE.
3. ENRIQUEZ, G. A.; SORIA, J. 1967. Cacao cultivars register. San José, C.R., IICA.
4. ERICKSON, B. J.; YOUNG, A. M.; STRAND, M. E.; ERICKSON JUNIOR, E. H. 1987. Pollination biology of *Theobroma* and *Herrania* (Sterculiaceae). II. Analyses of floral oils. Insect Sci. Appl. 8:301-310
5. HERNANDEZ, J. 1965. Insect pollination of cacao (*Theobroma cacao* L.) in Costa Rica. Doctoral Dissert. Madison. University of Wisconsin.

- 6 KAUFMANN, I. 1973. Preliminary observations on cecidomyiid midge and its role as a cocoa pollinator in Ghana. Ghana Journal of Agricultural Science 6:1093-1098
- 7 POSNETT, A.F. 1944. Pollination of cacao in Trinidad. Tropical Agriculture (Trinidad) 21:115-118
- 8 SOETARDI, R.G. 1950. De betekenis van insecten bij bestuiving van *Theobroma cacao* L. Archief Voor de Koffiecultuur (Indonesie) 17:1-31
- 9 SORIA, S. DE J.; WIRTH, W.W. 1979. Ceratopogonid midges (Diptera: Nematocera) collected from cacao flowers in Palmira, Colombia: An account of their pollinating abilities. Rev. Theobroma 9:77-84.
- 10 SORIA, S. DE J.; WIRTH, W.W.; BESEMER, H.A. 1978. Breeding places and sites of collection of adults of *Forcipomyia* spp. midges (Diptera, Ceratopogonidae) in cacao plantations in Bahia, Brazil: A progress report. Rev. Theobroma 8:21-29
- 11 SORIA, S. DE J.; SILVA, P.; CHAPMAN, R.K. 1982. Influence of floral pigmentation on field pollination rates in some cultivated varieties of *Theobroma cacao* L.: Some effects on yield. Rev. Theobroma 13:141-149
- 12 WINDER, J.A. 1977. Recent research on insect pollination of cocoa. Cocoa Growers' Bulletin 26:11-19.
- 13 WIRTH, W.W. and WAUGH, W.I. 1976. Five new Neotropical *Dasyhelea* midges (Diptera, Ceratopogonidae) associated with culture of cacao. Studia Entomologica 19:223-236
- 14 YOUNG, A.M. 1981. The ineffectiveness of the stingless bee *Trigona jaty* (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae) as a pollinator of cocoa (*Theobroma cacao* L.). Journal of Applied Ecology 18:149-155
- 15 YOUNG, A.M. 1983. Seasonal differences in abundance and distribution of cocoa-pollinating midges in relation to flowering and fruit-set between shaded and unshaded habitats of the La Lola Cocoa Farm in Costa Rica. Journal of Applied Ecology 20:801-831
- 16 YOUNG, A.M. 1984. Mechanism of pollination by Phoridae (Diptera) in some *Herrania* species (Sterculiaceae) in Costa Rica. Proceedings of the Entomological Society of Washington 86:503-518
- 17 YOUNG, A.M. 1985. Studies of cecidomyiid midges (Diptera: Cecidomyiidae) as cocoa pollinators (*Theobroma cacao* L.) in Central America. Proceedings of the Entomological Society of Washington 87:49-79
- 18 YOUNG, A.M. 1986. Distribution and abundance of Diptera in flypaper traps at *Theobroma cacao* L. (Sterculiaceae) flowers in Costa Rican cacao plantations. Journal of the Kansas Entomological Society 59:580-587.
- 19 YOUNG, A.M.; ERICKSON JUNIOR, E.H.; STRAND, M.E.; ERICKSON, B.J. 1987. Pollination biology of *Theobroma* and *Herrania* (Sterculiaceae). I. Floral biology. Insect Sci. Appl. 8:151-164
- 20 YOUNG, A.M.; ERICKSON, B.J.; ERICKSON JUNIOR, E.H. 1987. Steam-distilled floral oils of *Theobroma* species (Sterculiaceae) as attractants to flying insects during dry and wet seasons in a Costa Rican cocoa plantation. International Cocoa Research Conference (10, 1987, Santo Domingo, R.D.) Proceeding Santo Domingo, R.D. (In press).

Efectos de la Reforestación con *Pinus radiata* sobre la Diversidad y Abundancia de los Micromamíferos en un Agroecosistema de Chile Central¹

A. Muñoz*

R. Murua**

ABSTRACT

It has been postulated that extensive pine plantations (*Pinus radiata*) interfere with diversity and abundance of species, simplifying the ecological relationships between them. In order to validate the hypothesis for small mammals, two grids were set up, one in a pine stand and another in a native shrubland. Samples were taken during 18 months. Capture, marking and recapture methods to estimate diversity and abundance of small mammals were applied. The Shannon-Wiener Index was calculated to estimate the diversity of vegetation and small mammals. Foliage diversity was determined according to MacArthur and MacArthur. Diversity was higher in the shrubland than in the pine stand. The latter is explained by the higher spatial heterogeneity and productivity in shrubland than in the pine plantation.

COMPENDIO

Se estima que el monocultivo silvícola ha generado múltiples alteraciones ambientales, simplificando el número de relaciones ecológicas, con la consecuente variación en la diversidad y abundancia de las especies, modificando los mecanismos de regulación de las poblaciones. Con el objeto de validar esta hipótesis, se instalaron dos retículos para micromamíferos, uno, en un rodal de pino (*Pinus radiata*) y otro, en un matorral de renovales del bosque nativo. Se realizaron censos mensuales durante 18 meses, con el objeto de determinar la diversidad y abundancia de micromamíferos. Mediante los índices de Shannon Wiener, se calculó la diversidad de micromamíferos, la diversidad de la vegetación y la diversidad de la altura de follaje, según MacArthur y MacArthur. La diversidad y abundancia de micromamíferos fue significativamente mayor en el matorral, lo que se explica por la heterogeneidad espacial y la productividad que se expresa por la cantidad de recursos alimentarios y refugios disponibles en el matorral.

INTRODUCCION

El monocultivo silvícola produce múltiples alteraciones ambientales, al disminuir el número de posibles relaciones ecológicas en las comunidades, con el consecuente cambio en los patrones de diversidad y abundancia de las especies. En Nueva Zelanda, cuando se han reemplazado los bosques nativos del género *Nothofagus* sp por *Pinus radiata*, ha disminuido la diversidad de aves y mamíferos (2). Esta baja diversidad, post perturbación, se incrementa con la edad del rodal (sin llegar a ser superior al bosque nativo), pero, la lenta recolonización faunística en bosques jóvenes de *P. radiata* no permite el desarrollo de una lata diversidad por ser cultivos de rotación corta. Además, se ha observado la aparición de plagas de roedores que han ocasionado serios problemas a la población rural (4).

Desde la época colonial, en la zona central de Chile, se ha venido produciendo una profunda transformación del paisaje rural (1, 7).

El proceso se intensificó en el siglo pasado, con la deforestación de las zonas sur y centro-sur, a fin de expandir la frontera agrícola. En la zona costera de la comuna de Tomé (VIII Región), el denso bosque esclerófilo que existía comenzó a ser talado originando un matorral esclerófilo siempreverde. Desde 1922, se ha venido ejerciendo en la zona una sostenida reforestación o sustitución de matorrales y restos de bosques nativos por plantaciones de *P. radiata*, las cuales se han expandido hasta cubrir más de un millón de hectáreas entre la V a la VIII Región (3).

Esta investigación pretende establecer la forma y magnitud en que el monocultivo de *P. radiata* provoca cambios en las características de la asociación de micromamíferos de estos habitats, especialmente, con respecto a sus características comunitarias, diversidad y abundancia.

¹ Recibido para publicación el 20 de junio 1988.

Los autores agradecen a los Drs. Milton Gallardo y Carlos Moreno la revisión del manuscrito y sus valiosas sugerencias. También, al guardabosque, señor Eduardo Saavedra y al Ing. Arístides Lavandero, por el inestimable apoyo logístico en los trabajos de campo.

* Dpto. C.C. N.N.P. Universidad Católica de Chile, Sede Temuco. Casilla 15-D Temuco, Chile.

** Inst. de Ecología y Evolución. Universidad Austral de Chile. Casilla 567 Valdivia, Chile.

MATERIALES Y METODOS

El estudio se realizó en la localidad de Burca (predio "Lomas de la Madera", 36° 32' S; 72° 55' O), a

15 km al norte de Dichato (comuna de Tomé, VIII región, Chile) (Fig. 1) El área de estudio está a 200 m de altitud y a unos 3 500 m del mar; la topografía es de lomajes y cerros, surcados por quebradas muy abruptas. El clima corresponde al tipo templado-cálido, con estación seca semejante a la lluviosa, según Koeppen (12). Las precipitaciones alcanzan los 1292.8 mm (9); el mes más cálido es enero (18°C promedio) y el más frío es julio (9.6°C promedio)

El predio referido es de tipo forestal, dedicado al monocultivo de *P. radiata* ("Pino insigne"), con un denso sotobosque dominado por *Teline monspessulana* ("retamilla"), especialmente, en rodales menores de 10 años. También, existen pequeños sectores de renovales de especies nativas, ubicados preferentemente en claros del rodal a orillas de senderos, caminos, quebradas y aguadas. La edad del rodal de *P. radiata* fluctuó entre los cinco y seis años. Las especies de renovales que predominaron en el área fueron *Ugni molinae* ("murtilla"), *Escallonia pulverulenta* ("mardoño"), *Lithraea caustica* ("litre"), *Aristotelia chilensis* ("maqui"), *Gevuina avellana* ("avellano"), *Luma apiculata* ("arrayán") y *Peumus boldus* ("boldo").

Para conocer el efecto del monocultivo silvícola se tomaron datos, en forma simultánea, en un rodal de *P. radiata* y en un matorral de renovales del bosque nativo original. La información se obtuvo mediante la instalación de sendos retículos en una zona de matorral esclerófilo y otro en una zona de bosque monoespecífico de *P. radiata* y por análisis de la vegetación

a) **Instalación de retículos.** En las zonas de matorral y de bosque, se instalaron retículos de 80 x 80 m (0.64 ha), con estaciones fijas (estacas rotuladas) y dispuestas equidistantemente a 10 m entre ellas (Fig. 2). En cada coordenada, se instalaron sucesivamente trampas Sherman medianas (23 x 7.5 x 9.0 cm) y grandes (40 x 15 x 18 cm), cebadas con

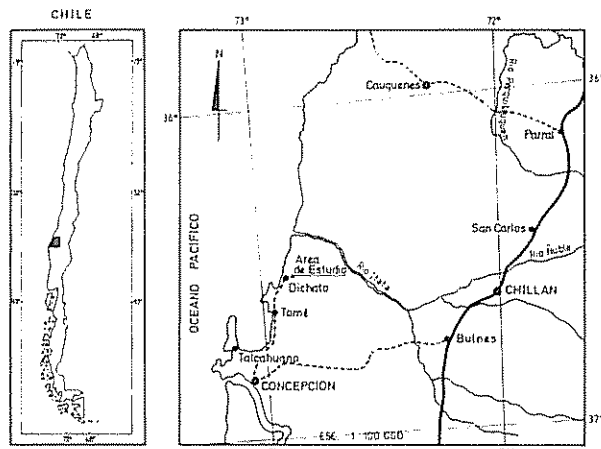


Fig. 1 Mapa del área de estudio.

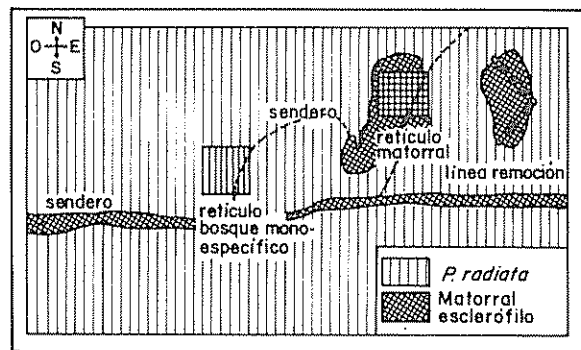


Fig. 2. Diagrama del sector de estudio. Burca VIII Región Chile.

avena machacada y protegidas de las condiciones climáticas por techos de madera de dos aguas. En este retículo, se efectuaron censos mensuales de cuatro noches, con dos revisiones diarias, por espacio de 18 meses (diciembre de 1983 a mayo de 1985). Las especies registradas fueron identificadas por medio de la clave de Mann (16). Para los casos de especímenes de identificación incierta, como *Octodon bridgesi* y *Phyllotis darwini*, se capturaron, fuera de los retículos (líneas de remoción), animales para analizar sus cráneos por medio de las claves de Reise (23) y Pearson (21). Los animales capturados fueron marcados por corte de falanges, según método modificado de De Blase (8) y sometidos *in situ* a un registro morfométrico y de condición reproductiva. Se estableció la "riqueza específica" *sensu* (13) y se calculó el Índice de Diversidad de Shannon-Wiener, en que la fórmula para la función es:

$$H' = - \sum_{i=1}^S (P_i \log_2 P_i) = 1$$

Donde H' es el índice de diversidad, S es el número de especies y P_i es la proporción del número total de individuos de la muestra que corresponde a la especie. La proporción (P_i) se entiende como las proporciones verdaderas de las poblaciones de estudio. El índice de diversidad se calculó, tanto en el matorral como en el bosque monoespecífico. Este índice integra dos componentes de la diversidad: el número de especies y la igualdad o desigualdad de la distribución en las diversas especies (14). Además, se calculó la equiparabilidad *sensu* (13), según la siguiente ecuación:

$$E = \frac{H'}{H'_{\text{máx}}}$$

Donde E es la equiparabilidad (que fluctúa en un ámbito de 0 a 1), H' es el índice de diversidad de especies observada y $H'_{\text{máx}}$ la diversidad máxima de

especies = $\log_2 S$. Se provee de intervalos de confianza empleando el método de acuchillamiento de datos ("jackknife") descrito en Jaksic y Medel (11). Este método paramétrico permite obtener estimadores de varianza y sesgo del índice de diversidad empleado, suponiendo una distribución multinomial del universo de muestreo. Por medio de eliminaciones sucesivas y posteriores reincorporaciones de datos, se generan "seudovalores" que son producto de la recomputación de la información. Los promedios aritméticos de estos "seudovalores" permiten el cómputo de la varianza, con las que se docima la hipótesis mediante una prueba de t de Student, descrita en Sokal y Rohlf (25).

La Abundancia Relativa (AR) se calculó a partir de la frecuencia absoluta de cada especie (n), expresada como porcentaje del total de animales capturados en un tiempo dado (N) y que se resume en la ecuación: $AR = n/N \times 100$

b) **Análisis de la vegetación.** Se analizó la vegetación existente, en otoño (mayo) y primavera de 1984 (octubre), tanto en el matorral como en el bosque. El análisis de composición proporcionó información referente a la densidad, dominancia y frecuencia relativa, así como el valor de importancia de las especies vegetales presentes. Se aplicó la técnica de análisis composicional ("Point-Quarter Technique") descrita por Cottam *et al* (6). Además, se calculó la diversidad empleando el índice de Shannon-Wiener.

Se estableció la estructura vegetacional, analizando las variables de los estratos herbáceos y arbustivos en torno a cada estación de muestreo, en un radio de 5 y 10 m. Mediante la metodología descrita por MacArthur y MacArthur (15), se estableció la densidad y diversidad de altura de follaje de los estratos herbáceos y arbustivos, además de perfiles de densidad de follaje. La diversidad de altura del follaje se calculó según la fórmula ($-\sum_i P_i \log_e P_i$), en que P_i es la proporción del follaje total que está en la iésima de las capas horizontales escogidas. Los perfiles se construyeron usando tablillas cuadrículadas con marcas a los 15, 30, 50 y 100 cm la que se movió hasta que desapareció, a la vista del observador, la mitad de la superficie tapada por el follaje. Luego, se midió la distancia entre el observador y la tablilla. La densidad del follaje a las diferentes alturas fue estimada según la fórmula:

$$K = \frac{0,69312}{D}$$

Donde K es la densidad del follaje, 0.69312 es el \log_e^2 y D es la distancia observador-tabilla cuadrículada

RESULTADOS

Composición, diversidad y estructura de la vegetación

La composición fue estudiada en ambas zonas en otoño. En el matorral se identificaron 44 especies vegetales (Cuadro 1) que son, en orden decreciente de importancia, las siguientes especies: *T. monspessulanus*, *U. molinae*, *E. pulverulenta*, *L. caustica*, *A. chi-*

Cuadro 1. Especies vegetales presentes en el área de estudio. Burca (VIII Región, Chile). V-1984.

Nombre científico	Nombre vulgar
<i>Teline monspessulanus</i>	"retamilla"
<i>Ugni molinae</i>	"murtilla"
<i>Escallonia pulverulenta</i>	"mardoño"
<i>Lithraea caustica</i>	"litre"
<i>Aristotelia chilensis</i>	"maqui"
<i>Gevuina avellana</i>	"avellano"
<i>Luma apiculata</i>	"arayón"
<i>Peumus boldus</i>	"boldo"
<i>Pinus radiata</i>	"pino insigne"
<i>Quillaja saponaria</i>	"quillay"
<i>Azara integrifolia</i>	"corcolén"
<i>Sphacele chamaedyoides</i>	"salvia"
<i>Lardizabala biternata</i>	"hierba del pasmo"
<i>Lomatia hirsuta</i>	"radal"
<i>Prunella vulgaris</i>	"hierba mora"
<i>Colletia spinosissima</i>	"crucero"
<i>Baccharis racemosa</i>	"chilca"
<i>Maytenus boaria</i>	"maitén"
<i>Uncinia sp</i>	"chíu-chíu"
<i>Greisia sphacelata</i>	"chupón"
<i>Aextoxicon punctatum</i>	"olivillo"
<i>Kageneckia oblonga</i>	"bollón"
<i>Solanum nigrum</i>	"hierba negra"
<i>Rosa moscheta</i>	"mosqueto"
<i>Ribes punctatum</i>	"zarza-parrilla"
<i>Rubus ulmifolius</i>	"zarza-mora"
<i>Fuchsia magellanica</i>	"chilco"
<i>Lobelia tupa</i>	"tupa"
<i>Carceolaria integrifolia</i>	"capachito"
<i>Cliococca selaginoides</i>	"merulahuén"
<i>Quinchamalium chilense</i>	"quinchamali"
<i>Plantago lanceolata</i>	"siete venas"
<i>Cuscuta chilensis</i>	"cabellos de angel"
<i>Conanthera bifolia</i>	"pajarito del campo"
<i>Acoena argenta</i>	
<i>Nassella exserta</i>	
<i>Alstroemeria ligtu</i>	
<i>Viola capillaris</i>	
<i>Cynosurus echinatus</i>	
<i>Myrceugenia obtusa</i>	
<i>Baccharis sphaerocephala</i>	
<i>Usnea megellanica</i>	"barba del viejo"
<i>Muhlenbeckia hastulata</i>	"coguil"
<i>Boquila trifoliata</i>	"pillí voqui"

Cuadro 2. Análisis de la composición vegetacional del matorral. Burca (VIII Región, Chile) mayo, 1984.

Especies	No.	Dens. (ind/ha)	Dens. Rel. %	Dom. %	Dom. Rel. %	Frec. %	Frec. Rel. %	Val. Import.
<i>Teline monspessulanus</i>	161	55 709	63.9	34.4	57.6	85.7	45.0	165.5
<i>Ugni molinae</i>	26	8 994	10.6	1.6	2.6	23.8	12.5	25.4
<i>Escallonia pulverulenta</i>	15	5 190	6.0	2.2	3.7	17.5	9.2	18.8
<i>Lithraea caustica</i>	8	2 764	3.2	2.2	3.6	9.5	5.0	11.8
<i>Aristotelia chilensis</i>	3	1 038	1.2	4.3	7.2	4.8	2.5	10.9
<i>Gevuina avellana</i>	4	138	1.6	3.8	6.4	3.2	1.7	9.2
<i>Luma apiculata</i>	1	340	0.4	4.6	7.7	1.6	0.8	8.9
<i>Peumus boldus</i>	5	1 730	2.0	2.3	3.9	4.8	2.5	8.4
<i>Pinus radiata</i>	7	2 422	2.8	0.5	0.8	7.9	4.2	7.7
<i>Quillaja saponaria</i>	2	692	0.8	1.2	1.9	3.2	1.7	4.4
<i>Azara integrifolia</i>	3	1 038	1.2	0.8	1.3	3.2	1.7	4.2
<i>Sphacele chamaedryoides</i>	3	1 037	1.2	0.1	0.1	4.8	2.5	3.8

lensis, *G. avellana*, *L. apiculata*, *P. boldus* y *P. radiata* (Cuadro 2)

En la zona de bosque mono-específico se identificaron sólo tres especies vegetales: *P. radiata*, *T. monspessulanus* y en forma muy aislada, manchones de *E. pulverulenta*, con algunas gramíneas asociadas. El suelo estaba completamente cubierto por acículas de *P. radiata*, *T. monspessulanus* sólo se encontró en los pequeños claros del bosque y muy especialmente, en los bordes de los senderos. Durante el estudio, se registró una gran cantidad de hongos.

La diversidad vegetal específica en la zona de matorral (H') fue de 0.830 (bits) con una H' máx = 8.076. En la zona de monocultivo, la diversidad fue de 0.259 (bits) con una H' máx = 1.585 (bits). La diversidad específica de vegetales fue significativamente mayor en el matorral ($g.l. = 8$, $P < 0.001$).

La estructura de la vegetación en ambas zonas se analizó en otoño. En el bosque mono-específico, el estrato herbáceo (15 y 30 cm de altura) ocupó un 61.98% del follaje total y el estrato arbustivo (50 y 100 cm de altura), el restante porcentaje (38.02). En la zona de matorral, en cambio, el estrato predominante fue el arbustivo, con un 62.72% y el estrato herbáceo, sólo ocupó un 37.27%. La diversidad de altura de follaje (DAF) fue levemente mayor en el matorral (DAF = 0.664), respecto al bosque mono-específico (DAF = 0.660).

En la Fig. 3 se observaron los perfiles de diversidad de follaje. En el del matorral esclerófilo se evidencia el predominio del estrato herbáceo ($K = 0.6736$ a los 15 cm); la diversidad disminuye pero vuelve a aumentar en el estrato a 50 cm ($K = 0.360$). En el bosque mono-específico, el perfil se presenta más comprimido y con una diversidad concentrada en el estrato arbustivo.

Diversidad de micromamíferos

El número de especies de micromamíferos o "riqueza de especies" encontrado en el matorral esclerófilo es mayor que en el bosque mono-específico de *P. radiata*. En el matorral, se registraron siete especies de micromamíferos; cinco roedores nativos: *Akodon olivaceus*, *Akodon (Abrothrix) longipilis*, *Phyllotis darwini*, *Oryzomys longicaudatus* y *Octodon bridgesi*, un roedor exótico: *Rattus norvegicus* y un marsupial nativo: *Marmosa elegans*. En el área de bosque de *P. radiata* se registraron tres especies de micromamíferos, todos ellos, roedores nativos: *Oryzomys longicaudatus*, *Octodon bridgesi* y *Akodon (Abrothrix) longipilis*.

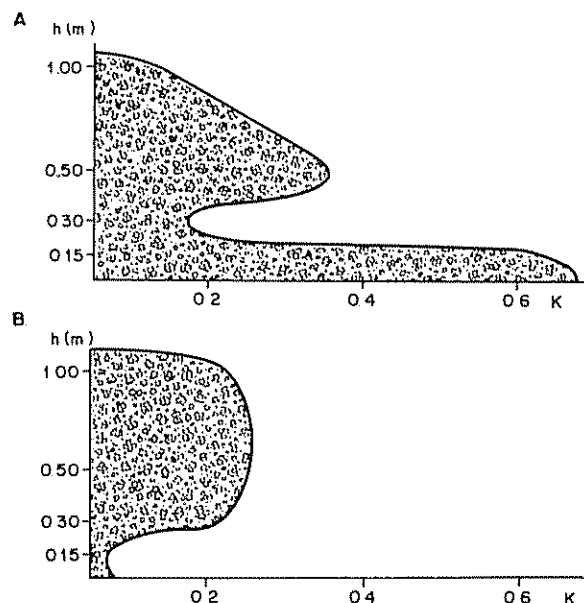


Fig. 3. Perfil de la diversidad de follaje (K) en el matorral esclerófilo (A) y en el bosque (B) en Burca (VIII Región, Chile) Otoño 1984. La altura está expresada en metros.

En el matorral, el índice de diversidad (H') fue de $1.881 \text{ bits} \pm 0.133$ con un $H'_{\text{max}} = 2.807$ y un $H'_{\text{min}} = 0.070$ y una equiparabilidad = 0.737 . En el bosque los valores fueron de $H' = 0.609 \text{ bits} \pm 0.308$, con un $H'_{\text{max}} = 1.585$ y $H'_{\text{min}} = 0.060$ con una equiparabilidad = 0.743

Lo anterior indica que la comunidad de vegetales, compuestos mayoritariamente por renovales de especies nativas, posee una diversidad de micromamíferos significativamente mayor que el bosque de monocultivo con *P. radiata* ($g = 8, P < 0.001$)

Abundancia relativa

La abundancia relativa en el matorral esclerófilo (fracción porcentual del total de animales capturados mensualmente), arrojó diferencias entre las especies y la época del año. Se observaron tres tendencias generales: la primera, marcada por un aumento de la abundancia relativa en primavera-verano y un decremento en otoño-invierno. Esta situación la ejemplifican *A. olivaceus*, *A. longipilis*, y *P. darwini* (Fig. 4A). La segunda tendencia está caracterizada por un aumento de la abundancia en primavera y un decremento en verano, otoño e invierno. Se ajustan a este modelo *O.*

bridgesi y *M. elegans* (Fig. 4B). Finalmente, la tercera tendencia está representada por *O. longicaudatus* que presenta su máxima abundancia relativa en el período otoño-invierno y la mínima, en primavera-verano (Fig. 4C).

A. olivaceus fue la especie más abundante en el matorral, superada sólo por *A. longipilis* en enero de 1984 y abril en 1985. *R. norvegicus*, de aparición esporádica, estuvo ausente en el primer verano; se registró en marzo (3%), y desapareció al mes siguiente para reaparecer en mayo (2%) y nuevamente desapareció hasta el próximo año. Surgió en enero con un 4% (máximo registro durante el período de estudio), se mantuvo en febrero con un 2% y desapareció hasta el fin del estudio.

La abundancia relativa en la zona de bosque mono-específico, también presentó diferencias entre las únicas tres especies capturadas (Fig. 5). Las tendencias registradas en el matorral son similares a las encontradas en el bosque; de este modo, *O. bridgesi* presenta una abundancia relativa máxima en primavera y una mínima en invierno y verano. *O. longicaudatus* presenta una máxima abundancia en invierno y una mínima en primavera-verano. Finalmente, *A. longipilis* registra una máxima en verano y una abundancia mínima en invierno. La especie más abundante en verano fue *A. longipilis* y en invierno *O. longicaudatus*.

Las frecuencias absolutas fueron menores en el bosque y las únicas especies con frecuencias absolutas altas (incluso, en ciertos meses, mayor que en el matorral) fueron: *A. longipilis* de diciembre a mayo y *O. longicaudatus* de mayo a agosto.

DISCUSION

La diversidad de micromamíferos en la zona de matorral esclerófilo fue mayor que en la zona de bosque mono-específico de *P. radiata*. Existen numerosas hipótesis para explicar la diversidad de especies en un hábitat. Hutchinson (10) propone considerar algunos probables factores causales, tales como: la longitud y número de los eslabones tróficos, la dimensión espacial, la subdivisión de los nichos y el carácter de mosaico del ambiente, entre otros. En el área de estudio, ambas zonas (matorral y bosque) están sometidas, prácticamente, a las mismas condiciones climáticas (a nivel microclimático existen diferencias muy pequeñas) por lo que sería improcedente considerar la hipótesis de estabilidad-tiempo (24). Por otro lado, la escala temporal a considerar es el tiempo ecológico en el que las especies ocupan un ambiente, pero aún no han podido dispersarse (13). Finalmente, el estudio puede ser considerado a escala local, pues aún cuando los rodales de *P. radiata* ocupan cientos de hectáreas, las manchas de matorrales esclerófilos ocupan superficies que rara vez superan una hectárea.

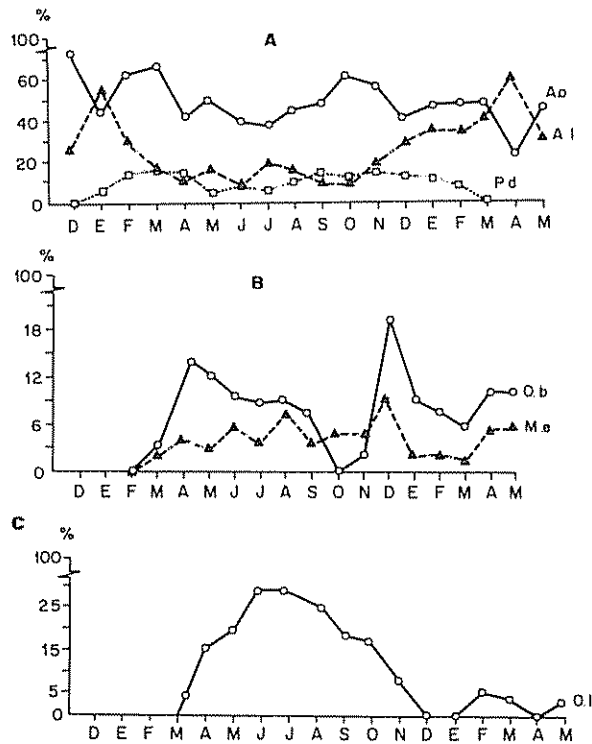


Fig. 4. Abundancia relativa de seis micromamíferos presentes en la zona de matorral en Burca (VIII Región, Chile) 1983-85.
 A. o = *A. olivaceus* A I = *A. longipilis*
 O. b = *O. bridgesi* M e = *M. elegans*
 P. d. = *P. darwini*
 O. l. = *O. longicaudatus*

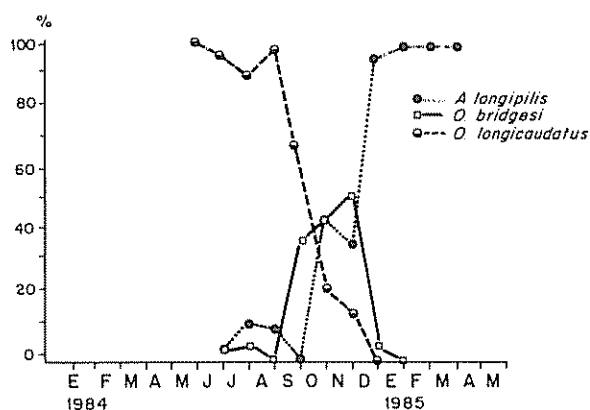


Fig. 5 Abundancia relativa en tres micromamíferos presentes en un rodal de *Pinus radiata* Burca VIII Región Chile

Para explicar esta mayor diversidad en el matorral se sugieren dos factores complementarios: la heterogeneidad espacial y la productividad. Ambos aspectos están centrados en un nivel primario en que actúa fundamentalmente el ambiente físico como condicionante (22).

Respecto a la heterogeneidad espacial se puede afirmar, en términos generales, que los hábitats estructuralmente complejos (matorral), ofrecen más variedad de microhábitat distintos que los más simples (bosque monoespecífico). MacArthur y MacArthur (15) estudiaron la diversidad de la avifauna de bosques deciduos, en relación con la diversidad de plantas y la altura del follaje. Concluyeron que este último factor es el determinante. Pianka (22) encontró una situación similar sosteniendo que la heterogeneidad espacial es determinante en la diversidad de lagartijas en tres desiertos de los EE UU. Las mediciones vegetacionales indicaron que la diversidad de estos animales no estaba relacionada con la diversidad de especies vegetales sino con el número de estratos vegetales. Los resultados de MacArthur y MacArthur (15) son particularmente válidos para áreas boscosas donde la estratificación vertical es determinante.

Sin embargo, los micromamíferos habitan en el suelo, dividiendo los microhábitats horizontalmente antes que verticalmente, explotando algunas especies los espacios abiertos entre arbustos y otras el suelo existente debajo, o cerca de formas de vida vegetal, como hierbas, arbustos y árboles. Además, un hábitat heterogéneo, como lo es el matorral de renovales, ofrece una mayor posibilidad de refugio contra los depredadores. La gran densidad de *T. monspesulanus*, unida a la práctica de cortarla sin retirarla del lugar, ofrece un hábitat óptimo desde el punto de vista del refugio. En cambio, en el rodal de *P. radiata*, el sotobosque es muy escaso y el suelo puede considerarse prácticamente desnudo, salvo, la gran cantidad de

aciculas que lo cubre. Las especies más abundantes en el bosque monoespecífico, *A. longipilis* y *O. longicaudatus*, son las únicas que muestran una fuerte asociación al estrato arbóreo y a suelos descubiertos (19).

Según Connell y Orians (5), a mayor producción existiría una mayor diversidad aún cuando el factor trófico no es suficiente para explicar la existencia de una diversidad alta (26). Entre los factores que también deben considerarse está la estabilidad ambiental, la cual asegura una disponibilidad temporal permanente de recursos alimentarios. En un hábitat de monocultivo, (de *P. radiata*) y con poco alimento disponible, los animales no pueden ser selectivos en sus preferencias. Por el contrario, en un hábitat con gran disponibilidad de alimento como lo es el renoval de bosque nativo, se permite una mayor especialización dietaria. Dado que las especies no utilizan la gama completa de alimentos disponibles, un amplio espectro alimentario permitirá la existencia de más especies (22).

De este modo, la forma en que la asociación de micromamíferos de la localidad Burca (VIII región, Chile), usa los recursos alimentarios, es variable, con diferencias tróficas notables en el matorral. En trabajos previos (19), se han descrito los hábitos alimentarios de las especies de roedores. Así, *M. elegans* aparece como una especie eminentemente insectívora; *O. bridgesi* es un herbívoro estricto; *P. darwini* consume *P. radiata* pero, a diferencia de *O. bridgesi* que consume corteza, ingiere semillas y acículas. *A. longipilis* es un omnívoro en verano pero que, en otoño e invierno, se transforma en fungívoro a diferencia de *O. longicaudatus* que incorpora, en esas mismas estaciones, artrópodos en su dieta. La localidad de Burca ofrece recursos alimentarios diversos y constantes. El matorral esclerófilo (inserto en el rodal mismo) ofrece más alimento respecto al bosque monoespecífico que solamente ofrece hongos y *P. radiata*. Sólo las especies que usan estos recursos como *A. longipilis* y *O. bridgesi*, podrán incursionar en el bosque. (La zona de matorral posee un sustrato indudablemente más rico que posibilita una mayor diversidad y densidad de invertebrados, potenciales recursos tróficos para micromamíferos como *M. elegans*, *A. longipilis* y *O. longicaudatus* (19). También, debe considerarse que el tiempo de búsqueda del alimento es menor en la zona de matorral que en el bosque monoespecífico. Por lo tanto, un hábitat homogéneo contendrá, desde el punto de vista de la disponibilidad alimentaria, especies generalistas que, además, dedican poco esfuerzo en la búsqueda de alimento al consumir según la oferta ambiental. Finalmente, la vagilidad será también condicionante para aventurarse en el bosque ya que está relacionada también con el esfuerzo de ob-

tención del alimento, al considerar el factor tiempo. En este caso, *A. longipilis*, *O. bridgesi* y sobre todo, *O. longicaudatus*, poseen la vagilidad necesaria para alimentarse en el bosque y regresar al matorral. Además de esta diferenciación trófica existe otra, en sus periodos de actividad: *A. longipilis* y *A. olivaceus* presentan actividad continua; en cambio, el resto de las especies es exclusivamente nocturno (19, 20). Estas separaciones temporal y trófica, son factores que contribuyen a la coexistencia de varias especies y por consiguiente, aumentan la diversidad de la comunidad.

Por los antecedentes descritos, es evidente que el bosque monoespecífico tiene una diversidad específica menor que el matorral. Esto no está determinado únicamente por la acción del fuego que se emplea como norma de manejo silvícola en la reforestación para eliminar las especies vegetales que podrían competir con las plántulas de *P. radiata*, sino más bien por el monocultivo silvícola. En ecosistemas de pastizal, bosque ralo y bosque denso, Marconi y Kravetz (18) demostraron que el fuego puede ser, por el contrario, un factor que genera una alta diversidad de micromamíferos al permitir la existencia del bosque ralo, que es un hábitat que alcanza la máxima abundancia y diversidad específica.

CONCLUSIONES

La diversidad específica es mayor en el matorral esclerófilo que en el bosque monoespecífico de *P. radiata*, considerándose la heterogeneidad espacial y la productividad como factores que ayudan a explicarla. La heterogeneidad espacial estaría asociada a una mayor diversidad de vegetales y a una estratificación horizontal y no a una mayor diversidad de altura de follaje.

La abundancia relativa en el matorral esclerófilo de la localidad de Burca es muy similar a la documentada en Chile Central. *A. olivaceus* fue la especie más abundante en el matorral y presentó una máxima en verano y una mínima en invierno. La segunda especie más abundante, *A. longipilis*, presentó los valores máximos en verano y la mínima en primavera; *O. bridgesi* y *O. longicaudatus* tuvieron una máxima en invierno y una mínima en verano; *P. darwini* presentó una máxima en primavera-verano y una mínima en invierno; *M. elegans* presentó valores bajos y estables. En el bosque monoespecífico, la especie más abundante fue *A. longipilis* en verano y *O. longicaudatus* en invierno.

LITERATURA CITADA

1. BAHRE, C. 1974. Land use in the Santa Laura. In Origin and Structure of Ecosystems. USA 54 p. Technical Report.
2. BULL, P. 1981. The consequence for the wildlife of expanding New Zealand's forest industry. New Zealand Journal of Forestry 26(2):210-231.
3. CAVIERES, A.; MARTNER, G.; MOLINA, R.; PAELLE, V. 1986. Especialización productiva, medio ambiente y migraciones: el caso del sector forestal chileno. In Transformación forestal y medio ambiente. Agricultura y Sociedad. Grupo de Investigaciones Agrarias G.I.A. (Chile) no. 4:34-95.
4. CLOUT, M. 1980. Ship rats (*Rattus rattus*) in a *Pinus radiata* plantation. New Zealand Journal of Ecology no. 3:141-145.
5. CONNELL, J.; ORIAN, E. 1964. The ecological regulation of species diversity. American Naturalist 98:399-414.
6. COTTAM, G.; CURTIS, J.; HALE, B. 1953. Some sampling characteristics of a population of randomly dispersed individuals. Ecology 34:741-757.
7. CUNILL, P. 1971. Factores en la destrucción del paisaje chileno; recolecciones, caza y tala coloniales. Revista Informaciones Geográficas 1971:235-264.
8. DE BLAISE, A.; MARTIN, R. 1979. Manual of mammalogy. New York, WMC Brown. 431 p.
9. FUENZALIDA, H. 1965. Clima. In Geografía económica de Chile. Santiago, Chile, Editorial Universitaria. p. 98-152.
10. HUTCHINSON, E. 1959. Homage to Santa Rosalía or why are there so many kinds of animals. American Naturalist 93:144-159.
11. JAKSIC, F.; MEDEL, R. 1987. El acuchillamiento de datos como método de obtención de intervalos de confianza y de prueba de hipótesis para índices ecológicos. Medio Ambiente (Chile) 8(2):95-103.
12. KOEPPEN, W. 1948. Climatología. México, D.F., Editorial Fondo de Cultura Económica. 158 p.
13. KREBS, C. 1985. Ecología. Estudio de la distribución y la abundancia. 2 ed. México, D.F., Harla, Harper & Row Latinoamericana. 753 p.
14. LLOYD, M.; GHELARDI, R. 1964. A table for calculating the equitability component of species diversity. Journal of Animal Ecology (33):217-225.

15. MACARTHUR, R.; MACARTHUR, J. 1961. On bird species diversity. *Ecology* 42:594-598.
16. MANN, G. 1957. Clave de determinación para las especies de mamíferos silvestres de Chile. *Investigaciones Zoológicas Chilenas* 4:89-126.
17. MANN, G. 1978. Los pequeños mamíferos de Chile. *Gayana, Zoología* no. 40:1-342.
18. MARCONI, P.; KRAVEITZ, F. 1986. Comunidades de roedores del Parque Nacional El Palmar (Entre Ríos, Argentina) según la historia del fuego. *Revista Chilena de Historia Natural* 59:47-57.
19. MUÑOZ, A. 1987. Ecología de micromamíferos presentes en un matorral esclerófilo y un rodal de *Pinus radiata* en Burca, VIII Región de Chile. Tesis Mag. Sc. Universidad Austral de Chile, Programa Facultad de Ciencias. 102 p.
20. MURUA, R.; GONZALEZ, L.; JOIRE, C. 1982. Estudios ecológicos de los roedores silvestres en los bosques templados fríos de Chile. Santiago, Museo Nacional de Historia Natural (Publ. Ocas no. 38). p. 105-116.
21. PEARSON, O. s.f. Keys for identifying crania and mandibles of small mammals living in or near Nahuel Huapi National Park and Lanin National Park. Southern Argentina. *Mat. multicop.* 26 p.
22. PIANKA, E. 1982. *Ecología evolutiva*. Barcelona, Editorial Omega. 365 p.
23. REISE, D. 1973. Clave para la determinación de los cráneos de marsupiales y roedores chilenos. *Gayana, Zoología* no. 27:1-20.
24. SANDERS, H. 1968. Marine benthic diversity: a comparative study. *American Naturalist* no. 102: 243-283.
25. SOKAL, R.; ROHLF, F. 1981. *Biometry*. San Francisco, California, W H Freeman. 776 p.
26. WHITESIDE, M.; HAMSWORTH, R. 1967. Species diversity in Chydorid (Cladocera) communities. *Ecology* no. 48:664-667.

Notas y Comentarios

Tortuguitas que sobreviven la congelación

Las jóvenes tortugas pintadas (*Chrysemys picta marginata*), no sólo invernan durante el invierno canadiense; se congelan completamente. En la primavera, se licúan, despiertan y prosiguen su vida. El encontrar cómo ellas alcanzan esta insólita estrategia de supervivencia puede ayudarnos a preservar órganos humanos para trasplantes, dicen Kenneth Storey y sus colaboradores de las Universidades de Carleton y Guelph en Ontario (*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 85).

Las tortugas pintadas ponen sus huevos en huecos poco profundos en el verano. Al emerger de los huevos, al final del otoño, las tortuguitas, en vez de encarar a los predadores y a los fuertes inviernos, se quedan debajo de la superficie hasta que llegue la primavera. Storey midió las temperaturas de los huecos de postura en Algoquin Park, Ontario, y encontró que éstas bajaban hasta -8°C , pero, las tortugas sobrevivían. Encontró que más de la mitad del total de agua de su cuerpo se volvía hielo y el animal se ponía "tieso al tacto".

Cuando se descongelaban, las pequeñas tortuguitas recuperaban los latidos de su corazón, después comenzaban a respirar antes de comenzar a moverse.

Una vez totalmente descongeladas, las tortuguitas se movían y comían en forma normal.

Generalmente, las células animales se encogen cuando se congelan, se rompen y se mueren. Storey analizó los tejidos de la tortuga y encontró cantidades anormalmente altas de glucosa, glicerol y taurina, un aminoácido que se encuentra en sitios como la hiel de buey (ácido 2 aminoetano sulfónico). Estas sustancias reducen el encogimiento de las células cuando se congelan y ayudan a sobrevivir a las tortuguitas. Otro problema del congelamiento es la anoxia: cuando la sangre deja de circular, la provisión de oxígeno a los tejidos también se para. Los tejidos pueden continuar funcionando sin oxígeno, pero, el metabolismo anaeróbico resultante es ineficiente y necesita grandes cantidades de glucosa. Las tortugas podrían estar usando grandes cantidades de glucosa para mantener tal respiración anaeróbica. Storey encontró un revelador producto de desecho de un metabolismo anaeróbico, un lactato, en las tortugas congeladas.

Un hallazgo inesperado fue que, al comienzo de la primavera, las tortugas pueden todavía tolerar la congelación, aún cuando los niveles de las sustancias químicas que parecen protegerlas, son mucho más bajos que en el invierno. Adalberto Gorbitz †.

Development and Fecundity of the Southwestern Corn Borer, *Diatraea grandiosella* Dyar (Pyralidae, Lepidoptera), as Affected by Host Plant Water Stress¹

M. Aslam*, R.J. Witworth*, J.R. Goodin**

ABSTRACT

Studies were conducted to compare the effect of different plant water stress levels on the southwestern corn borer (SWCB), *Diatraea grandiosella* Dyar. High plant water stress reduced leaf area and plant height but did not affect stem diameter. Host plant water stress had no effect on SWCB larval development time or pupal weight. Adult emergence was 20.0% to 33.0% less in high water stress (35-25% field capacity) treatment when compared with medium (55-45% field capacity) and non-stressed (10-80% field capacity) treatments. Fertility was reduced 7.6% to 16.8% in adults from water-stressed plants.

INTRODUCTION

The southeastern corn borer (SWCB), *Diatraea grandiosella* Dyar, described in 1911 from Mexico where it is widely distributed, except in the southern states (11), was reported from New Mexico in the United States in 1913 (8). It is now established in 14 states in the U.S. corn belt (17). The SWCB mainly infests corn, *Zea mays* L. (9) and damage may be caused by larvae feeding in the whorl resulting in "dead heart," tunneling in the stock, and/or stalk girdling (13). Corn losses in the USA have been estimated at about 1% annually (28), but losses in individual fields may reach 100% (24).

Corn is mostly grown under rain-fed conditions and thus water stress may develop periodically and can cause physiological changes in the plant. Water stress can reduce plant respiration (3) and photosynthesis (19), which may in turn affect the insects' feeding upon the plants (16). Effect of host plant water stress on insects varies depending upon the host and the insect species. Many studies have been conducted on aphid/host plant water stress. A reduction in aphid reproductive rate on water-stressed brus-

COMPENDIO

Se comparó el efecto de diversos niveles de escasez de humedad del suelo sobre el barrenador del tallo del maíz, *Diatraea grandiosella* Dyar. Niveles altos de tensión de agua del suelo redujeron el área foliar y la altura de las plantas de maíz, pero no afectaron el diámetro del tallo. La deficiencia de agua en el suelo no tuvo efecto sobre el tiempo de desarrollo larvario o el peso de las pupas. La emergencia de adultos fue de 20.0 a 33.0% más bajo en plantas bajo altos niveles de tensión de agua en el suelo (35-25% de la capacidad de campo) en comparación con plantas bajo condiciones de tensión media (55-45% de la capacidad de campo) y plantas con suficiente humedad (100-80% de capacidad de campo). La fertilidad de las palomillas desarrolladas en plantas con deficiencia de humedad fue reducida 7.6 a 16%.

sels sprouts (25) and spindle beet (16) has been reported, but no effect was reported on water-stressed beans (26).

Observations have been reported relative to the effect of host plant water stress only on the SWCB, from the Pyralidae, i.e. SWCB damage to corn was greater when it received less irrigation as compared to a well-irrigated crop (7). No systematic study has been conducted in this area of host plant/SWCB interaction. Thus, this study was conducted to compare the effect of different plant water stress levels on development, fecundity and fertility of the SWCB. This information may be useful in making management decisions for corn producers in affected areas.

MATERIALS AND METHODS

A corn hybrid (Funk G 4507) was grown in the greenhouse using a mixture of peat moss; soil (clay loam); number 2 perlite (ratio 2:1:1) in plastic containers 30.0 cm deep and 28.0 cm in diameter. Five lots of 100 g of the mixture were oven-dried at 100°C for 48 h. After drying the mixture was wetted and its field capacity was determined as follows:

$$\frac{\text{wet weight} - \text{dry weight}}{\text{wet weight}} \times 100$$

¹ Received for publication 17 August 1988.

* Kansas State University, Manhattan, KS 66506.

** Texas Tech University, Lubbock, TX 79401.

Treatments consisted of the following:

- T₁ (no water stress) = 100-80% field capacity
 T₂ (medium water stress) = 55-45% field capacity
 T₃ (high water stress) = 35-25% field capacity

Fourteen plants were utilized per treatment in a completely randomized design, treating each plant as an experimental unit and a replication. Ten extra plants were grown and maintained as in T₁. These plants were dissected to monitor the insects' development and for measurement of weight gain in test plants during the experiment. The study was conducted for two seasons. Mean temperature and relative humidity during the experiments were 27.0°C and 70.7% RH in the first and 27.8°C and 43.3% RH in the second season. Studies were conducted in natural light and photoperiod at Texas Tech University, Lubbock, Texas during 1984 and 1985.

Containers were watered daily to insure healthy plant growth during the prestress period. Plants were subjected to water stress after 44 days in the first year and 33 days in the second year. Containers were weighed daily on a Universal[®] Accu-weigh dial scale and water was added when soil reached the required moisture depletion levels. Leaf water potential (-MPa) was recorded with a P.M.S.[®] pressure chamber (20) and leaf temperature, diffusive resistance, and transpiration were recorded using a Li-Cor[®] LI-1600 steady state porometer (15) at 13:00 to 14:00 h periodically.

After completion of the first stress cycle, a one-day-old SWCB larva was placed on the ear leaf of each plant using a camel hair brush. Larvae from laboratory-reared stock were used. When pupae were found in extra plants, which were dissected periodically, all test plants were dissected and tunnel length, plant height, leaf area (using Li-Cor[®] leaf area meter), and

stem diameter were recorded, and pupae collected. Pupae collected from these plants were weighed using a Mettler[®] unipan electronic balance and maintained in cages (40.0 x 25.0 x 30.0 cm) in a growth chamber at 26.5°C and 65.0% RH. Pupae from each treatment were caged together in discrete cages. Adult emergence was recorded from each treatment.

Eggs were obtained from wax paper strips taken from the adult emergence cages, counted, and maintained in 3.5 l glass jars in growth chambers. The number of eggs per female was recorded and percent fertility was calculated by counting the larvae eclosed from each treatment. Data were analyzed by GLM procedure and Duncan's multiple range test to compare treatments.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of water stress on corn

Leaf water potential and diffusive resistance were not significantly different ($P > 0.05$) among the three treatments (Table 1). Water stress levels in the three treatments were based on field capacity and not on leaf water potential. When leaf water potential was recorded, plants were at different field capacities because of water application one to three days prior to sampling. This water application might have masked the difference in the treatments. Transpiration rate was significantly lower ($P < 0.05$) in the medium and high stress treatments compared to the non-stressed treatment.

Leaf area in the non-stressed treatment was significantly greater ($P < 0.05$) than with high stress. Plant height was significantly different ($P < 0.05$) between the three treatments in the first year, with height being greatest in non-stressed plants. Only high water stress resulted in a significant reduction ($P < 0.05$)

Table 1. Effect of water stress on corn*.

Year	Treatment	Leaf water potential (-MPa)	Diffusive resistance (s cm ⁻¹)	Transpiration (μg cm ⁻² s ⁻¹)	Leaf area (cm ²)	Plant height (cm)	Stem diameter (cm)
1st	No stress	1.45 a	9.11 a	6.76 a	5 799.5 a	298.3 a	1.8 a
	Medium stress	1.52 a	12.85 a	4.97 b	5 405.2 ab	243.8 b	1.8 a
	High stress	1.51 a	13.51 a	3.84 b	5 110.4 b	239.2 b	1.7 a
2nd	No stress	1.23 a	6.50 a	4.80 a	3 102.4 a	134.4 a	1.4 a
	Medium stress	1.36 a	15.00 a	3.40 b	2 721.4 ab	122.3 a	1.3 a
	High stress	1.30 a	12.10 a	3.50 b	2 505.3 b	102.8 b	1.5 a

* Means in same column for each year followed by the same letter are not significantly different ($P > 0.05$) using Duncan's Multiple Range Test.

in plant height in the second year. Water stress had no significant effect on stem diameter. Reduction in leaf area (1, 5, 10) and plant height (10, 22) in corn as a result of water stress has also been reported by other workers

Effect of host plant water stress on SWCB

Developmental time of SWCB from first instar to pupal stage was 414 thermal units in the first year and 478 in the second year (mean = 446) when calculated using the equation developed by Whitworth and Poston (27). Thus, the experiments were terminated when the majority of the SWCBs were in the pupal stage in all treatments. Although a few larvae were still present, all pupated within two days. These observations indicate that host plant water stress does not seem to affect SWCB developmental time.

Tunnel length measurements (Table 2) were recorded for the second year only and no significant difference ($P > 0.05$) was found between treatments. Apparently, the amount of larval feeding was not influenced by host plant water stress. Pupal weight in all three treatments was not significantly different ($P > 0.05$) for both years. This also suggests that the food consumed and utilized by larvae was unaffected by host plant water stress. Although pupal weight was not significantly different among the three treat-

ments, adult emergence in the high stress treatment was 20% to 33% less when compared with medium and non-stressed treatments.

Data for adult emergence, fecundity, and fertility could not be analyzed statistically because pupae from each treatment were maintained in the same cage. No clear trend was noted in fecundity (eggs/female) in relation to host plant water stress. Fertility (% eclosion) was 13.0% and 16.8% less in the first year, and 10.8% and 7.6% in the second year in medium and high stress treatments, respectively.

Plant water stress in corn may cause reversible (2, 4, 18, 21) or irreversible (14) changes in protein, nitrogen, proline, and certain enzymes depending upon the degree and duration of the stress. Water stress may reduce protein synthesis (23) and it has been reported that protein contents may be reduced by 9.0% in water-stressed corn plants (12). The lower protein may be responsible for lower SWCB fertility. Changes in certain nutrients affect SWCB females more adversely than males (6) and the complex changes in the corn plant as a result of water stress might also be responsible for lower fertility.

Based on the present results, it can be expected that SWCB infestation following a dry season might be lower because adult emergence and eclosion will be reduced in drought-affected corn.

Table 2. Effect of host plant water stress on southwestern corn borer*.

Year	Treatment	Tunnel length (cm)	Pupal weight (g)	Adult emergence (%)	Fecundity ¹	Fertility ²
1st	No stress	—	0.25 a	83.3	168	43.5
	Medium stress	—	0.25 a	80.0	253	30.5
	High stress	—	0.23 a	50.0	193	26.7
2nd	No stress	13.5 a	0.22 a	87.5	283	40.3
	Medium stress	12.1 a	0.20 a	86.6	240	29.5
	High stress	14.0 a	0.18 a	66.6	305	32.7

* Means in same column for each year followed by the same letter are not significantly different ($P > 0.05$) using Duncan's Multiple Range Test.

1 Mean number of eggs oviposited per female

2 Mean percent eclosion

LITERATURE CITED

1. ACEVEDO, E I ; HSIO, I.C.; HENDERSON, D.W. 1971. Immediate and subsequent growth response of maize leaves to changes in water status. *Plant Physiology* 48:631-636
2. BARDZIK, J M ; MARSH JUNIOR, H.V.; HAVIS, J.R. 1971. Effects of water stress on the activities of three enzymes in maize seedlings. *Plant Physiology* 47:828-831.
3. BELL, D. I.; KOEPE, D E ; MILLER, R. J. 1971. The effect of drought stress on respiration and isolated corn mitochondria. *Plant Physiology* 48:413-415
4. BLUM, A ; EBERCON, A. 1976. Genotypic responses in sorghum to drought stress. III. Free proline accumulation and drought stress. *Crop Science* 16:428-431.
5. BOYER, J.C. 1970. Leaf enlargement and metabolic rates in corn, soybean and sorghum at various leaf water potentials. *Plant Physiology* 46:233-235.
6. CHIPPENDALE, G.M. 1975. Ascorbic acid: An essential nutrient for plant feeding insect, *Diatraea grandiosella*. *Journal of Nutrition* 105:449-507.
7. DANIELS, N.E. 1978. Insecticidal and cultural control of southwestern corn borer. *Southwestern Entomologist* 3:308-314
8. DAVIS JUNIOR, E.G.; HORTON, C.H.; GABLE, C.H.; WALTER, E.V.; BLANCHARD, R.A.; HEINRICH, C. 1933. The southwestern corn borer. United States Department of Agriculture Technical Bulletin no. 388. 61 p
9. DAVIS, F.M.; WILLIAMS, W.P. 1983. Second generation southwestern corn borer (Lepidoptera: Pyralidae): Ear and stalk damage to susceptible and resistant maize. *Journal of Economic Entomology* 76:507-509.
10. DENMEAD, O.T.; SHAW, R.H. 1960. The effect of soil moisture stress at different stages of growth on the development and yield of corn. *Agronomy Journal* 52:272-274.
11. DYAR, H.G. 1911. The American species of *Diatraea* (Lepidoptera: Pyralidae). *Entomological News* 22:199-207.
12. GENKEL, P.A.; SATAROVA, N.A.; IVORUS, E.K. 1967. Effect of drought on protein synthesis and the state of ribosomes in plants. *Soviet Plant Physiology* 14:754-762
13. HENDERSON, C.A.; DAVIS, F.M. 1969. The southwestern corn borer and its control. Mississippi Experiment Station Bulletin no. 773. 16 p.
14. HSIO, I.C. 1970. Rapid changes in levels of polysomes in *Zea mays* in response to water stress. *Plant Physiology* 46:281-285.
15. KANEMASHU, E.I.; IHURIELL, G.W.; TANNER, C.B. 1969. Design, calibration and field use of a stomatal diffusion porometer. *Plant Physiology* 44:881-885
16. KENNEDY, J.S.; BOOTH, C.O. 1959. Responses of *Aphis fabae* Scop. to water shortage in host plants in the field. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 2:1-11.
17. KIKUKAMA, S.; CHIPPENDALE, G.M. 1983. Seasonal adaptations of populations of the southwestern corn borer, *Diatraea grandiosella*, from tropical and temperate regions. *Journal of Insect Physiology* 29:561-567.
18. MATTIAS, R.E.; PAULI, A.W. 1965. Trends in nitrate reduction and nitrogen fractions in young corn (*Zea mays* L.) plant during heat and moisture stress. *Crop Science* 5:181-184.
19. MOSS, D.N.; MUSGRAVE, R.B.; LEMON, E.R. 1961. Photosynthesis under field conditions. III. Some effects of light, carbon dioxide, temperature, and soil moisture on photosynthesis, respiration, and transpiration of corn. *Plant Physiology* 1:83-87
20. SCHOLANDER, P.F.; HAMMEL, H.I.; BRADSTREET, E.D.; HEMMINGSEN, E.A. 1965. Sap pressure in vascular plants. *Science* 148:339-346
21. SHANER, D.L.; BOYER, J.S. 1976. Nitrate reductase activity in maize (*Zea mays* L.) leaves. II. Regulation by nitrate flux at low leaf water potential. *Plant Physiology* 58:505-509.
22. THUT, H.F.; LOOMIS, W.E. 1944. Relation of light to growth of plant. *Plant Physiology* 19:117-130
23. VAADIA, Y.; RANEY, C.F.; HAGAN, R.M. 1961. Plant water deficits and physiological processes. *Annual Review of Plant Physiology* 12:265-292
24. WALTON, R.R.; BIEBERDORF, G.A. 1948. Seasonal history of the southwestern corn borer, *Diatraea grandiosella* Dyar in Oklahoma; and experiments on methods of control. Oklahoma Agricultural Experiment Station Technical Bulletin no. T-32. 32 p
25. WEARING, C.V. 1972. Responses of *Myzus persicae* and *Brevicoryne brassicae* to leaf age and water stress in brussels sprouts grown in pots. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 15:61-80
26. WEARING, C.W.; VAN EMDEN, H.F. 1967. Studies on the relations of insect and host plant. I. Effect of water stress in host plants on infestation by *Aphis fabae* Scop., *Myzus persicae* (Sulz) and *Brevicoryne brassicae* L. *Nature* 213:1051-1052.
27. WHITWORTH, R.J.; POSTON, F.L. 1979. A thermal unit accumulation system for the southwestern corn borer. *Annals of the Entomological Society of America* 72:253-255.
28. WISEMAN, B.R.; MORRISON, W.P. 1981. Components for management of field corn and sorghum insects and mites in the United States. Agricultural Research Service, Agricultural Reviews and Manuals no. 4-ARM-18. 18 p

Micropropagación de Tres Aráceas Comestibles Libres de Virus¹

L. Gómez, Ml. Monge*, R. Valverde*, O. Arias*, T. Thorpe**

ABSTRACT

A method for the rapid multiplication of three edible aroids, which were free of Dasheen Mosaic Virus (DMV) in vitro, is presented. Plants of taro, and white and purple cocoyam were developed from shoot apex culture in vitro and determined to be free of DMV. Under aseptic conditions the roots and the aerial parts were eliminated, leaving only a small portion consisting of the central corm. This portion was divided by two transverse cuts into three zones: apical, middle, and basal. These sections were cultured on a Murashige and Skoog medium supplemented with indoleacetic acid (IAA; 0.01 and 0.05 mg · l⁻¹) and with 6-benzylaminopurine (6-BAP 0, 1.00, 2.00 and 4.00 mg · l⁻¹) in all possible combinations, with the aim of inducing the development of the pre-formed axillary buds. The greatest production of axillary bud breaks occurred in the apical zone; in the middle and basal zones, there was practically no bud growth. The combination of 0.05 mg · l⁻¹ IAA and 1.00 mg · l⁻¹ of 6-BAP led to the greatest number of development buds in the three cultures; an average of 5 shoots in the purple cocoyam and taro, and 3.35 in the white cocoyam were formed. Use of the entire corm from which the terminal bud was removed, produced the greatest number of shoots, similar to that of the apical section. Furthermore, this method reduced the required amount of manipulation of the material. Shoots rooted without problem in the medium with or without growth regulators and after 40-45 days, complete plants were obtained. They could be transplanted to non-sterile conditions, or could be used for in vitro multiplication again. The percentage survival at the time of establishment ex vitro was 95 to 100%. This method of propagation in vitro increases the number of plants produced, when compared to conventional methods, and opens up the possibilities of establishment of a program of production of "seeds" of virus-free edible aroids. In addition, it facilitates the conservation of plants free of virus with a low risk of re-infection, as well as the international exchange of healthy material.

INTRODUCCION

Los géneros comestibles de la familia Araceae (*Xanthosoma* y *Colocasia*) son una fuente importante de alimento e ingreso en diversas regiones tropicales y subtropicales (15, 22)

¹ Recibido para publicación el 28 de junio 1988

* Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica.

** Grupo de Investigaciones en Fisiología Vegetal, Departamento de Biología, Universidad de Calgary, Canadá.

COMPENDIO

Se presenta un método para la multiplicación rápida in vitro de tres aráceas comestibles, libres del Virus del Mosaico de la Malanga (DMV). Se tomaron plántulas de ñampí, tiquisque blanco y tiquisque morado desarrolladas in vitro y certificadas como libres del DMV. Bajo condiciones asépticas, se les eliminó las raíces y la parte aérea, dejando únicamente una pequeña porción compuesta por el cormo central. Dicha porción se dividió, mediante dos cortes transversales, en tres zonas: apical, media y basal. Estas secciones se cultivaron en un medio de Murashige y Skoog suplementado con Acido Indolacético o AIA (0, 0.01 y 0.05 mg · l⁻¹) y con 6-Bencilaminopurina o 6-BAP (0, 1, 2 y 4 mg · l⁻¹). En todas sus posibles combinaciones, con el fin de inducir el desarrollo de las yemas axilares preexistentes. La mayor producción de brotes ocurrió en la zona apical; en las zonas media y basal prácticamente no hubo brotadura. La combinación de 0.05 mg · l⁻¹ de AIA + 1.00 mg · l⁻¹ de 6-BAP permitió la obtención del mayor número de brotes en los tres cultivos: cinco brotes en tiquisque morado y en ñampí y 3.35 brotes en tiquisque blanco. Con el empleo del cormo central, en etapa completa de formación y en ausencia de la yema terminal, se obtuvo un número de brotes similares al de la sección apical y se redujo el manipuleo del material. Los brotes enraizaron sin problema, tanto en el medio con reguladores de crecimiento como en ausencia de los mismos. A los 40-45 días se obtuvieron plántulas completas que pueden ser transferidas a condiciones no estériles o bien, utilizadas nuevamente en el proceso de multiplicación in vitro. El porcentaje de sobrevivencia al establecimiento en invernadero fue del orden del 95 al 100%. El método de propagación in vitro aumenta la tasa de multiplicación en mayor grado, con relación a los métodos convencionales y abre la posibilidad de establecer un programa de producción de "semilla" de aráceas comestibles que esté libre de virus. Además, facilita la conservación de las plantas libres de virus sin riesgo de reinfección y el intercambio internacional de material sano.

En Costa Rica, su cultivo se ha incrementado en los últimos años como producto de exportación no tradicional, debido a su buena aceptación en los mercados de Norte América y Europa. Por otra parte, su gran adaptación al trópico bajo húmedo (TBH) les brinda amplias posibilidades como cultivo base para el desarrollo de esta zona ecológica que comprende el 48% del territorio nacional, pero alberga sólo al 24% de la población (18). Las aráceas se propagan tradicionalmente en forma vegetativa con el uso de cormos principales y cormos laterales (15). Esto ha contribuido a la diseminación y generalización de en-

fermedades entre las que se destacan las infecciones virales y dentro de éstas, el virus mosaico de la malanga (Dasheen Mosaic Virus o DMV) es el de mayor relevancia (24). Este virus fue inicialmente descrito por Zettler *et al* en Florida (23) y desde entonces se ha encontrado en por lo menos 10 países pertenecientes a tres continentes (24). En Costa Rica, Ramírez (17) encontró que la incidencia del virus en las plantaciones comerciales de tiquisque (*Xanthosoma* spp) es por lo menos de 80%. Por su parte, Monge y Arias (10) y Monge *et al* (11) establecieron que este patógeno causa disminuciones en el rendimiento de por lo menos un 47% en tiquisque morado (*X. violaceum*), un 24% en tiquisque blanco (*X. sagittifolium*) y de un 17% en ñampi (*C. esculenta* var. *antiquorum*). Además, observaron un deterioro en la calidad del producto por efecto del patógeno (10).

El cultivo *in vitro* de ápices caulinares (meristema más uno o dos primordios foliares) de estas especies se ha utilizado con éxito para la obtención de plantas libres de DMV (4, 5, 9, 11, 20). La aplicación de esta técnica, sin embargo, se ve limitada por el tiempo necesario para la obtención de las plantas sanas y por una baja tasa de multiplicación. Se requieren entre dos y cuatro meses, en el mejor de los casos, para la diferenciación de las plántulas (4, 11). En investigaciones en las que se ha inducido la formación de un callo, previo a la diferenciación de plantas, se informa de una tasa de multiplicación que varía de uno a siete (20). Cuando la organogénesis es directa (6). Las plantas muestran una fuerte dominancia apical y no ocurre brotadura (11).

El establecimiento de un método eficiente de multiplicación de las plantas libres de virus es necesario si se desea optimizar los rendimientos y mejorar la calidad del producto en las aráceas comestibles. Para *X. caracu*, Asokan, O'Hair y Litz (1) desarrollaron un método de multiplicación rápida que permite obtener entre 45 y 70 plantas por ápice cultivado en un periodo de 14 a 16 semanas, a partir de ápices con tres o cuatro primordios foliares. Estos autores emplearon una fase previa de cultivo en medio líquido y en agitación constante; señalaron, además, la posibilidad de aplicar el método utilizando ápices provenientes de plantas certificadas como libres del DMV.

El presente trabajo expone un método de micropropagación que permite la multiplicación rápida de plantas de ñampi, de tiquisque blanco y de tiquisque morado libres de virus.

MATERIALES Y METODOS

Se trabajó con plántulas de ñampi (*C. esculenta* var. *antiquorum*), de tiquisque blanco (*X. sagittifolium*)

y de tiquisque morado (*X. violaceum*) desarrolladas *in vitro* según la metodología previamente descrita (11). Además, estas plantas se certificaron como libres de virus mediante la técnica de tinción de las inclusiones citoplasmáticas (3). Bajo condiciones asépticas se eliminaron las raíces y la parte aérea (incluido el meristema apical), dejando únicamente una pequeña porción compuesta por el cormo principal en formación. El cormo se refiere a la estructura sólida del tallo a partir de la cual se desarrolla la parte aérea de la planta. A dicha porción se le practicaron dos cortes transversales obteniendo tres secciones de cormo que se denominaron zona apical, zona media y zona basal, de acuerdo a su cercanía al meristema apical (Fig. 1A). Estas secciones se colocaron en un medio de cultivo que consistió de las sales inorgánicas de Murashige y Skoog (13) (MS); $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de inositol, $0.4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de hidrocloreuro de tiamina, $0.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de piridoxina, $0.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de ácido nicotínico y 3% de sacarosa. Este medio básico se suplementó con los reguladores de crecimiento, ácido indolacético (AIA) (0:0.01 y $0.05 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) y 6-bencilaminopurina (6-BAP) (0:1; 2 y $4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) en todas sus posibles combinaciones. El pH del medio se ajustó a 5.7 previo a la adición del agar (Sigma, 0.8%). El medio se esterilizó en autoclave a 1 atm de presión

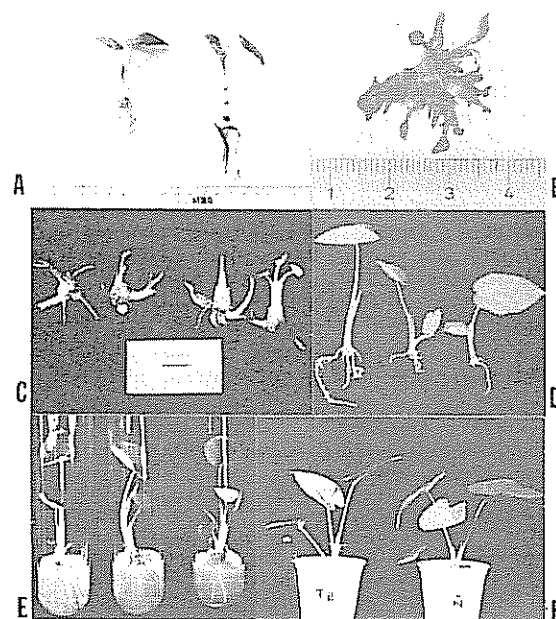


Fig. 1. Pasos en la micropropagación de aráceas libres de virus. A. Seccionamiento del cormo central en formación (tiquisque blanco). B. Sección apical mostrando nuevos brotes (ñampi). C. Proliferación de brotes axilares en el cormo central sin yema terminal (a, b) y con terminal (c, d) ñampi). D. Parte aérea resultante del seccionamiento, enraizada en una mezcla de suelo: piedra pómez-3:1 (ñampi, tiquisque morado, tiquisque blanco). E. Desarrollo de los brotes axilares a los 25-30 días (ñampi). F. Plantas de tiquisque blanco (TB) y de ñampi (N) un mes después de su transplante a suelo.

durante 15 minutos. En este experimento se utilizaron tubos de cultivo de 150 x 25 mm en los que se colocó 10 ml de medio.

Los cultivos se incubaron en una cámara de crecimiento ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) con un fotoperíodo de 12 h y una intensidad aproximada de $46 \mu\text{M E m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Se utilizaron 150 plántulas de cada especie, para un promedio de 12 secciones de cada zona por tratamiento (una sección/tubo).

RESULTADOS

En experiencias preliminares se trató de multiplicar plantas libres de virus, de las tres especies, a partir de plántulas completas y de ápices. Las primeras se cultivaron en un medio MS + $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de kinetina + $2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de AIA y en el segundo caso se evaluaron dosis crecientes de las citocininas: 6-bencilomino-purina, kinetina y 2-isopentoniladenina en dosis desde cero hasta $40 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ a intervalos de $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. En ambos casos, la mayor brotadura obtenida fue de dos a tres brotes, en el mejor de los casos.

Lo anterior motivó a que se considerara el seccionamiento del corno principal en formación, en analogía a lo que ocurre en la propagación convencional (19), como un método de multiplicación. Para ello, se cultivaron estas secciones en las diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento (AIA/6-BAP), a fin de promover una mayor producción de brotes.

A) Respuesta de las secciones

La Fig. 2 muestra el número de brotes (promedio de todos los tratamientos) que se obtuvo en cada zona en las tres especies. La mayor producción de brotes ocurrió en la zona apical. En las zonas media y basal, la brotadura fue pobre. No se observó diferencia entre especies para esta tendencia aunque el número de brotes promedio por sección varió para cada una de ellas.

B) Efecto de los reguladores de crecimiento

Debido a la escasa brotadura obtenida en las zonas media y basal, en adelante se describen únicamente los resultados obtenidos utilizando la sección apical.

El Cuadro 1 muestra el efecto de las diferentes combinaciones de AIA/6-BAP sobre la producción de brotes en la zona apical de las tres especies, después de 60 días de incubación. La combinación de $0.05 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de AIA y $1.00 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de 6-BAP posibilitó la obtención del mayor número de brotes en los tres cultivos: 5 brotes en tiquisque morado y

en ñampi y 3.35 brotes en tiquisque blanco. También, se observaron casos excepcionales en los que se obtuvo hasta 13 brotes por sección apical (Fig. 1C). En tiquisque blanco se obtuvo una brotadura similar a la de la mejor combinación de AIA/6-BAP ($0.05/1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) con la sola aplicación de AIA, a razón de $0.01 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$.

C) Efecto del genotipo

Se observaron diferencias entre los cultivos en relación a la producción de brotes en respuesta al seccionamiento y a la aplicación de reguladores de creci-

Cuadro 1. Producción *in vitro* de brotes en la zona apical del corno central en formación de tres especies de aráceas comestibles en respuesta a la aplicación de diferentes niveles de auxina y citocinina. Resultados a los 60 días.

AIA/6-BAP (mg/l)	No. de brotes (\bar{X})*			
	Tiquisque blanco	Tiquisque morado	Ñampi	
0	0	1.60	1.25	0.05
	1	2.25	3.00	1.70
	2	1.70	3.00	2.25
	4	2.25	1.75	0.75
0.01	0	3.00	0.30	1.30
	1	1.30	4.50	1.30
	2	2.30	4.00	1.70
	4	1.00	3.50	1.50
0.05	0	1.30	1.50	0.70
	1	3.35	5.00	5.00
	2	1.30	1.25	2.50
	4	0.75	2.50	1.40

* Número de brotes promedio, obtenido a partir de 150 explantes de cada especie.

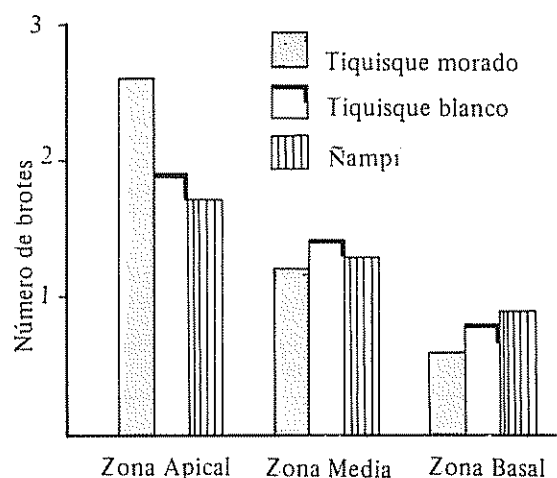


Fig 2 Número de brotes que se produjeron en cada sección del corno central en formación, en las tres especies (promedio de 12 tratamientos).

miento (Cuadro 1, Fig. 3). En ñampi, prácticamente no ocurrió brotación en ausencia de reguladores de crecimiento mientras que en tiquisque blanco y en tiquisque morado, la brotación fue similar a la observada en varias combinaciones de AIA/6-BAP. En tiquisque morado y en ñampi se observó una inhibición en la inducción de la brotación con la dosis de $4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de 6-BAP en ausencia de AIA (Figs. 3b y 3c), no así en tiquisque blanco (Fig. 3a). En términos generales, para tiquisque morado y ñampi, conforme se aumentó la dosis de 6-BAP, la producción de brotes fue menor. La aplicación de AIA pareció disminuir este efecto inhibitorio (Fig. 3)

D) Efecto de la supresión de la yema terminal

En otra experiencia se evaluó el efecto de la combinación $0.05 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de AIA + $1.00 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de BAP sobre la producción de brotes en el cormo principal, con y sin yema terminal (Cuadro 2). En el cormo sin yema apical, se obtuvo un número de brotes similar al obtenido con la zona apical. Cuando la yema apical estuvo presente, se observó un rápido crecimiento del brote principal y una disminución en el número y en el desarrollo de los nuevos brotes (Fig. 1C)

Por otra parte, cuando se eliminó la yema terminal dejando una sección de cormo adherida a la base de la parte aérea, fue posible recuperar la planta madre mediante el enraizamiento de este material en una mezcla de suelo - piedra pómez (3:1) (Fig. 1D). Se observó, sin embargo, que el número de brotes obtenido *in vitro* fue menor conforme aumentó el tamaño de la sección del cormo adherida a la parte aérea.

En todos los casos, la presencia de los brotes fue visible después de 5 a 7 días de incubación. Cuando los brotes permanecieron unidos al tejido madre, a los

Cuadro 2. Efecto de la supresión de la yema terminal en la producción de brotes axilares en ñampi (*Colocasia esculenta* var. *antiquorum*) tiquisque morado (*Xanthosoma violaceum*) y tiquisque blanco (*Xanthosoma sagittifolium*) incubados en un medio MS + $0.05 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de AIA + $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de 6-BAP. Resultados a los 25 días de incubación.

Tratamiento	No. de brotes* (\bar{X})		
	Tiquisque blanco	Tiquisque morado	Ñampi
Sin yema terminal	3.3	4.0	4.0
Con yema terminal	1.6	1.6	2.6

* Promedio de 10 explantes por tratamiento.

60 días se tienen plántulas completas que pueden ser separadas y transferidas a condiciones no estériles o bien, utilizadas nuevamente en el proceso de multiplicación *in vitro*. En este periodo, sin embargo, se observó un desarrollo desigual entre los brotes demostrado por diferencias en tamaño. Cuando los brotes fueron separados, al alcanzar un tamaño adecuado para su fácil disección (15 días después de incubación) y transferidos a un medio sin reguladores de crecimiento, se obtuvieron plántulas completas y de tamaño

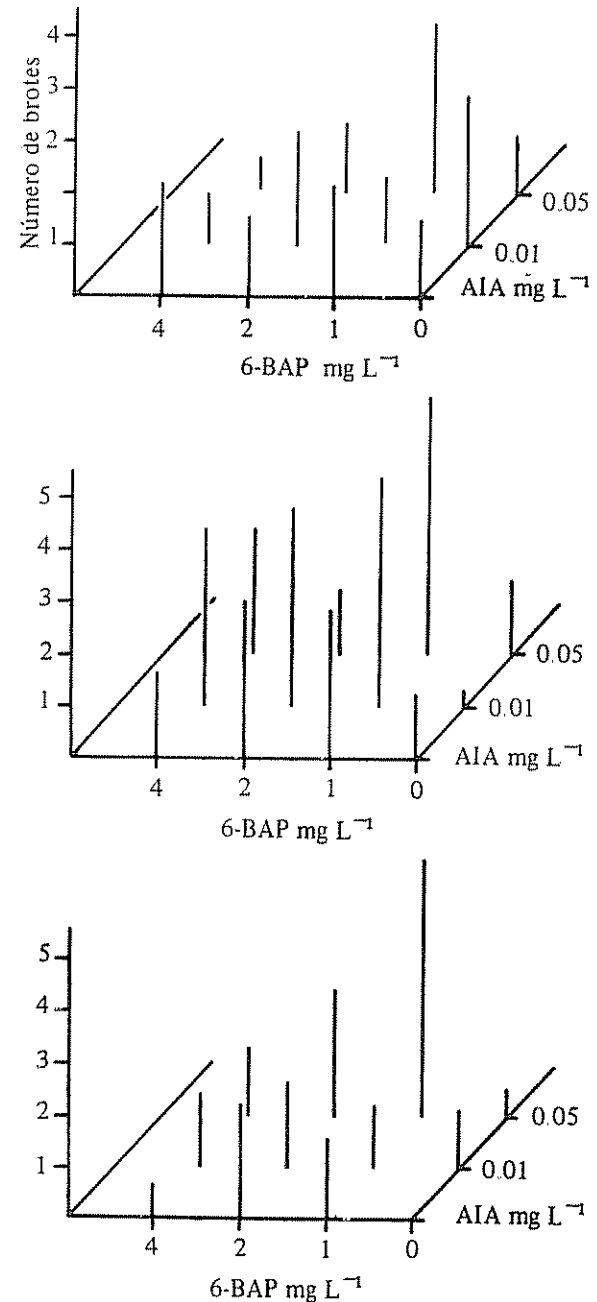


Fig. 3. Número de brotes producidos en la zona apical en Tiquisque Blanco (A), Tiquisque Morado (B), y Ñampi (C) después de 60 días de incubación.

uniforme en un período de 40 a 45 días (Fig 1E), las cuales se pueden transplantar a condiciones no estériles o continuar en el proceso de multiplicación (Fig 1E)

Las plantas obtenidas *in vitro* se transfirieron a condiciones no estériles según la metodología previamente descrita (11), con la variante de la utilización de un sistema de neblina ("mist") en lugar de los vasos plásticos para mantener una alta humedad relativa. El porcentaje de sobrevivencia fue del orden de 95-100% (Fig 1F)

DISCUSION

La multiplicación *in vitro* de plantas se puede realizar mediante uno o varios de los siguientes procesos: La embriogénesis somática, la inducción de brotes adventicios y el aumento de la proliferación axilar (13). Los resultados expuestos son un ejemplo del tercer proceso. En las aráceas comestibles, el cormo principal o central representa al tallo, del cual salen los demás órganos de la planta (raíces, hojas y cormelos). Las hojas están unidas al cormo por largos pecíolos y parten del ápice de éste en una distribución en espiral. En la base de los pecíolos, se diferencian las yemas axilares (15, 20). La naturaleza axilar de la brotadura obtenida *in vitro* se manifiesta en la aparición de los brotes en diferentes planos, siguiendo una disposición en espiral (Fig 1C), similar a la que presentan las hojas; además, el número de brotes obtenido guardó relación con el número de hojas que poseían las plantas. Brotes de origen adventicio pudieron estar presentes en aquellos casos en los que se observó un gran número por sección (Fig 1B), aunque no se realizó un estudio histológico para comprobar este fenómeno. Tampoco se observaron variaciones morfológicas en las plantas obtenidas.

La micropropagación mediante el estímulo de la proliferación axilar es preferida sobre otros procesos, especialmente aquellos que involucran una fase previa de callo, aun cuando el número de brotes inicial sea bajo (de tres a cinco en este caso), debido a que se logra una mayor estabilidad genética en las plantas regeneradas. Este hecho es importante si interesa mantener las características de la planta madre. Los meristemas axilares son menos propensos a cambios genéticos, en comparación con los meristemas adventicios (7).

Con el sistema de micropropagación, expuesto en el presente estudio, es posible obtener una elevada producción de plántulas a partir de una planta sana sobre la base de un incremento exponencial. Es posible obtener de tres a cinco nuevos brotes cada 40 a 45 días, los cuales se pueden multiplicar en ciclos susce-

sivos. Los métodos de propagación convencional requieren mucho tiempo y área de cultivo; son sumamente costosos y tienen una tasa de multiplicación relativamente baja. Además, las plantas están expuestas a los ataques de plagas y enfermedades que causan un deterioro paulatino del material de siembra. En el caso particular de las aráceas comestibles, el DMV y el complejo "marchitamiento-pudrición" de las raíces o "mal seco" son los principales problemas patológicos. En un trabajo previo, con plantas libres del DMV (12, 14), se estableció, bajo condiciones de campo, que un ciclo de cultivo fue suficiente para que ocurriera una reinfección total del material.

Las plantas de los géneros *Xanthosoma* y *Colocasia*, obtenidas *in vitro* por lo que Hicks (6) llama organogénesis directa, presentan una fuerte dominancia apical. En esta investigación se encontró que es posible incrementar la brotadura, en ambos géneros, mediante la combinación del seccionamiento del cormo principal y la aplicación exógena de reguladores de crecimiento (auxina/citocinina). Un tratamiento similar ha sido descrito por otros investigadores en cala (2) y en banano (22). A diferencia de lo que ocurre en otras monocotiledóneas (7, 8), se encontró una pobre respuesta a la brotadura cuando el único fitorregulador en el medio de cultivo fue la citocinina (bencilaminopurina). La adición del ácido indolacético (AIA) aparentemente modificó el rango de acción de la bencilaminopurina (6-BAP) y favoreció la brotadura en la mayoría de las combinaciones evaluadas, sobre todo en tiquisque morado y en ñampi (Fig. 3). En este sentido, es conveniente señalar que la utilización de las auxinas como modificadoras de la acción de la citocininas en la promoción del crecimiento axilar ha sido, también, propuesta por Hussey (7) para otras monocotiledóneas. Por otra parte, generalmente, se prefiere utilizar únicamente citocininas para obviar y/o reducir al máximo la posibilidad de la formación de callo. En esta ocasión, en ninguna de las combinaciones auxina/citocinina utilizadas, se observó callo, lo que reduce las posibilidades de variación.

La diferencia observada entre secciones para la producción de brotes (Fig. 2) se debe, probablemente, al número de yemas presentes en cada zona del cormo. En bulbos y cormos, las yemas axilares están muy próximas entre sí (8), al seccionar el cormo es posible concentrar un buen número de ellas en una de las zonas. Por otra parte, en las aráceas comestibles, los pecíolos de las hojas emergen del ápice del cormo lo que hace suponer que en la zona apical existe el mayor número de yemas axilares. Esto se relacionó estrechamente con el hecho de que, al eliminar el ápice dejando una sección del cormo adherida a la base de la parte aérea, el número de brotes obtenido *in vitro* disminuyó.

Por otra parte, el cultivo *in vitro* (del cormo principal, con y sin yema terminal, permitió establecer la influencia de la yema apical sobre la producción y el desarrollo de los nuevos brotes. Cuando el ápice estuvo presente, disminuyeron tanto el número como el tamaño de los brotes (Cuadro 2, Fig. 1C) debido a un efecto de dominancia apical, lo que refuerza las observaciones preliminares sobre la fuerte dominancia apical que muestran estas especies así como la necesidad de combinar la supresión de la yema apical y la utilización de los reguladores de crecimiento para estimular la mayor producción de brotes. Resultados congruentes con los obtenidos en esta investigación han sido publicados por Soto y Arce (19) y por Pardales y Dalion (16) en trabajos con proposición convencional. Los primeros encontraron que, cuando

las plantas provienen de propágulos sin yema terminal, producen un mayor número de brotes. Los segundos, por su parte, desarrollaron un sistema de propagación rápida para *C. esculenta* mediante la eliminación de la yema terminal de los cormelos.

Finalmente, los resultados obtenidos en esta investigación dejan claramente establecido un procedimiento para la propagación por cultivo *in vitro* de las aráceas comestibles, el cual permite la multiplicación rápida de un gran número de plantas sanas y genéticamente idénticas abriendo la posibilidad de establecer un programa permanente de producción de "semilla" básica libre de virus y de otros patógenos con lo cual se aseguran mejores rendimientos agronómicos y calidad superior de la cosecha.

LITERATURA CITADA

- ASOKAN, M.P.; O'HAIR, S.K.; LIIZ, R.E. 1984. Rapid multiplication of *Xanthosoma caracu* by *in vitro* shoot tip culture. HortScience 19(6):885-886.
- COHEN, D. 1982. Micropropagation of *Zantedeschia* hybrids. Combined Proceeding International Plant Propagators Society 31:312-316.
- CHRISTIE, R.G.; EDWARSON, I.R. 1977. Light and electron microscopy of plant virus inclusions. USA, Fla., Agricultural Experiment Stations. 155 p. Monograph Series no. 9.
- GUPTA, P.P. 1985. Plant regeneration and variabilities from tissue culture of cocoyams (*Xanthosoma sagittifolium* and *X. violaceum*). Plant Cell Reports 4:88-91.
- HARTMAN, R.D. 1974. Dasheen (DMV) en Costa Rica other phytopathogens eliminated from caladium, taro and cocoyam by culture of shoot tips. Phytopathology 64:237-240.
- HICKS, G.S. 1980. Patterns of organ development in plant tissue culture and the problem of organ determination. The Botanical Review 46(1):1-23.
- HUSSEY, G. 1976. *In vitro* release of axillary shoots from apical dominance in monocotyledonous plantlets. Annals of Botany 40:1323-1325.
- HUSSEY, G. 1977. *In vitro* propagation of some members of Liliaceae, Iridaceae and Amaryllidaceae. Acta Horticulturae 78: 303-309.
- JACKSON, G.V.; BALL, E.A.; ARDITTI, J. 1977. Tissue culture of taro, *Colocasia esculenta* (L.) Schott. Journal of Horticultural Science 52:373-382.
- MONGE, M.; ARIAS, O. 1984. Efecto del virus del mosaico en tiquisque (*Xanthosoma sagittifolium*) In Congreso Agronómico Nacional (6, San José, C.R.). Resúmenes. San José, Colegio de Ingenieros Agrónomos pp. 197-198.
- MONGE, M.; ARIAS, O.; RAMIREZ, P. 1987. Obtención de plantas de tiquisque blanco (*Xanthosoma sagittifolium*), de tiquisque morado (*Xanthosoma violaceum*) y de ñampi (*Colocasia esculenta*) libres de virus por medio del cultivo *in vitro* de ápices. Agronomía Costarricense 11(1):71-79.
- MONGE, M.; GOMEZ, L.; VALVERDE, R.; ARIAS, O. 1987. Evaluación preliminar del comportamiento en el campo de plantas de ñampi (*Colocasia esculenta* var *antiquorum*) provenientes del cultivo *in vitro* de ápices. Agronomía Costarricense 11(2): 189-194.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15:473-497.
- OBANDO, I.; FALLAS, M.; MONGE, M.; VALVERDE, R. 1986. Estudio preliminar sobre la tasa de reinfección viral y el rendimiento en el campo de tiquisque blanco, propagado *in vitro*. In Congreso Agronómico Nacional / Congreso de Horticultura de la Sociedad Americana de Ciencias Hortícolas Región Tropical A.S.H.S. (33, San José, C.R.). Resúmenes. San José, Colegio de Ingenieros Agrónomos/Sociedad Americana de Ciencias Hortícolas Región Tropical A.S.H.S. v. I, p. 363-364.
- ONWENE, I.C. 1978. The tropical tuber crops: yams, cassava, sweet potato, cocoyam. New York, Wiley 234 p.

16. PARDALES, J.R.; DALION, S.S. 1986. Methods for rapid vegetative propagation of taro. *Tropical Agriculture (Trinidad)* 63(4):268-280.
17. RAMIREZ, P. 1985. Aislamiento y caracterización del virus del mosaico del Dasheen mosaic virus and Rica Turrialba (C.R.) 35(3): 79-283
18. RODRIGUEZ, W. 1984. Aráceas comestibles en Costa Rica. In Congreso Agronómico Nacional (6, San José, C.R.) Secciones Perspectivas y Actualización. San José, C.R., Colegio de Ingenieros Agrónomos p. 87-107.
19. SOTO, J.A.; ARZE, J.A. 1986. Variabilidad en las poblaciones de tiquisque morado (*Xanthosoma violaceum*) en relación con el material de propagación I. Peso del propágulo y presencia o ausencia de la yema terminal. *Turrialba (C.R.)* 36(1):39-46
20. STRAUSS, M.S.; ARDITTI, J. 1980. Plantlet regeneration from shoot tip cultures of *Xanthosoma caracu*. *Annals of Botany* 45(2):209-212.
21. WANG, J.K. 1983. Taro: A review of *Colocasia esculenta* and its potentials. U.S.A., University of Hawaii Press. 400 p.
22. WONG, W.C. 1986. In vitro propagation of banana (*Musa* spp.): initiation, proliferation and development of shoot-tip cultures on defined media. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 6(2): 159-166.
23. ZETTLER, F.W.; FOXE, M.J.; HARTMAN, R.D.; EDWARDS, J.R.; CHRISTIE, R.C. 1970. Filamentous viruses infecting dasheen and other araceous plants. *Phytopathology* 60:983-987.
24. ZETTLER, F.W.; HARTMAN, R.D. 1987. Dasheen mosaic virus as a pathogen of cultivated aroids and control of the virus by tissue culture. *Plant Diseases* 71(11):958-963.

Notas y Comentarios

Gusanos disfrazados

Las orugas de una mariposa llamada *Nemoria arizonaria* se esconden de los predadores tomando la forma de los alimentos mismos que ellas comen. Las orugas *Nemoria* emergen en dos hornadas, una en primavera y la otra en verano; pero las dos hornadas son bastante diferentes. Erick Greene, en la Universidad de Princeton, en New Jersey, encontró que las larvas que nacían en primavera se desarrollaban como orugas que se parecían a las yemas florales del roble del cual se alimentaban (*Science*, v. 243, p. 643). Estas yemas son de un color amarillo intenso, con muchas pequeñas proyecciones en su cuerpo. Tienen también muchos pequeños puntos pardos en su espalda, que simulan los estambres de esas yemas florales.

Las larvas que nacen en verano se desarrollan como orugas que parecen ramillas. Ellas son de color verdigris, con proyecciones mucho más pequeñas. Las orugas nacidas en verano también tienen mandíbulas mucho más grandes que las de las nacidas en primavera lo que les permite comer las correosas hojas del roble. Las larvas nacidas en verano difieren en otros aspectos, aparte de la dieta: se adaptan a las temperaturas más altas y a los días más largos.

Con el objeto de encontrar lo que hace que las orugas se desarrollen diferentemente, Greene crió las larvas en el laboratorio. Encontró que la dieta era crucial: todas las larvas se desarrollaban en la forma de ramitas si se les daba de comer hojas, cualquiera que fuese la temperatura o la cantidad de luz. Similarmen-

te, todas las larvas alimentadas con yemas se desarrollaban en la "forma de yemas".

Las hojas contienen niveles mucho más altos de taninos que las yemas. Entonces, para establecer el efecto de los taninos, Greene trató de criar larvas con o sin esos compuestos. Seis por ciento de las larvas criadas con hojas, o con yemas más taninos, desarrollaron en la forma de yemas y doce por ciento desarrollaron en esta forma si las alimentaba con yemas y hojas a la vez. Pero, 94 por ciento se desarrollaron en la forma de yemas si las alimentaba solamente con yemas.

Las larvas que nacen en la primavera tienen una ventaja sobre aquellas que nacen en verano. Las yemas son más nutritivas que las hojas, de manera que éstas son más grandes cuando se transforman en pupas. Las mariposas hembras producidas de orugas nacidas en primavera, también producen más crías que aquellas nacidas en verano. Una oruga que vive entre hojas también encara un riesgo más grande de ser detectada y comida por los pájaros.

Pero, si ser una "forma yema" de oruga tiene tal ventaja, ¿por qué *Nemoria* no evolucionó para producir sólo orugas que parecían yemas? La razón, sugiere Greene, es que es ventajoso para las mariposas que emergen de las formas de yema el producir una cría ese verano, antes de esperar la primavera. Cualquier forma de yema que no produjese larvas capaces de volverse como ramitas, simplemente produciría una descendencia menor que la que si lo pudiese. Adalberto Gorbitz.

Biología y Tabla de Vida de *Typhlodromus pilosus* Chant (ACARI: Phytoseiidae) en Costa Rica¹

H. Aguilar*, L. A. Salas*

ABSTRACT

The life history of *Typhlodromus pilosus* was studied at an average temperature of 23.7°C and relative humidity of 67%. Incubation periods were ca. 2.3 days for females and 2.4 days for males. The larval and protonymphal stages lasted 1.2 days for females and 1.1 for males. The deutonymphal stage lasted 1.3 days for both males and females. Total developmental time for females was 6.1 and for males 5.9 days. The larvae ate an average of 2.5 *Tetranychus neocaledonicus* eggs. After a preovipositional period of 2.7 days, adult females laid an average of 1.6 eggs/day for 15.9 days while eating an average of 5.8 eggs of *T. neocaledonicus* per day. The longevity of *T. pilosus* was considerable. The male survived almost 60 days, eating 1.2 eggs/day. Females lived between 60 and 90 days, consuming an average of 1.6 eggs/day during their postovipositional stages. Males and females ate *T. neocaledonicus* eggs, basically; they did not consume pollen or sap; no cannibalism was observed. A life table was constructed from the life history data. It was showed that a population of this predator could multiply 16.42 times in a generation time of 12.78 days. Under the given conditions, the intrinsic rate of increase was 0.219 individuals/female per day for *T. pilosus*. The finite rate of increase was 1.24 times/female per day.

COMPENDIO

Se estudió la biología de *Typhlodromus pilosus* Chant en condiciones de laboratorio, a una temperatura promedio de 23.7°C y a una humedad relativa promedio de 67%. El período de incubación del huevo duró aproximadamente 2.3 días para la hembra y 2.4 días para el macho. Los estados larval y protoninfal emplearon 1.2 y 1.1 días para hembras y machos, respectivamente. La duración del estado deutoninfal, tanto en hembras como en machos, fue de 1.3 días. El tiempo de desarrollo total fue de 6.1 días para las hembras y de 5.9 días para los machos. Las larvas consumieron un promedio de 2.5 huevos de *Tetranychus neocaledonicus* (André), las protoninfas 3.8 y las deutoninfas 4.0 a lo largo de sus respectivos estados. Las hembras adultas, después de un período preovipositional de 2.7 días, pusieron un promedio de 1.6 huevos por día durante 15.9 días; a lo largo de ese tiempo, consumieron un promedio de 5.8 huevos de *T. neocaledonicus* diarios. La longevidad de hembras y machos adultos fue de aproximadamente 90 y 60 días, respectivamente. No se alimentó de polen, savia, ni presentó canibalismo. La tabla de vida mostró que una población de este depredador podría multiplicarse 16.42 veces en un lapso generacional de 12.78 días. La tasa intrínseca de incremento natural para *T. pilosus* fue de 0.219 individuos por hembra por día, y la tasa finita de crecimiento fue de 1.24 veces por hembra por día.

INTRODUCCION

En Costa Rica, las arañas rojas son plagas muy importantes pues infestan a una amplia gama de hospederos, entre ellos, plantas ornamentales, frutales y otros (1, 4, 16).

El ácaro *Tetranychus neocaledonicus* (André) se ha convertido en una de las plagas de ácaros de mayor distribución en este país; dado su potencial de reproducción y rápida diseminación, no debe descuidarse su combate en ningún momento (1).

Por esas dos características, es necesario conocer otras alternativas de combate que complementen el realizado químicamente. Por esa razón, se considera indispensable orientar las investigaciones hacia los sistemas naturales de manejo de poblaciones. Los ácaros de la familia Phytoseiidae podrían convertirse en una opción, viable para mantener las poblaciones de ácaros plaga bajo el umbral económico (3, 8, 9, 10).

Esta investigación se realizó con el objeto de contribuir, a través del estudio de la biología y de la tabla de vida del fitoseido *Typhlodromus pilosus* Chant, a la búsqueda de esas alternativas de combate de los ácaros fitoparásitos.

MATERIALES Y METODOS

La investigación se hizo en el Laboratorio de Acarología de la Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica, entre febrero y agosto de 1986. Los ácaros *Typhlodromus pilosus* y *Tetranychus neocaledonicus*, así como material vegetal de la planta reina de la noche (*Brugmansia* spp.), empleados en el ensayo,

1 Recibido para publicación el 15 de diciembre de 1988. Parte de la tesis de Ing. Agr. presentada por el primer autor a la Escuela de Fitotecnia de la Universidad de Costa Rica. Los autores desean manifestar su agradecimiento al Dr. Róger López, del Laboratorio de Nematología, Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica; y al Lic. Luis Fernando Jirón, Director del Museo de Insectos, Universidad de Costa Rica, por la revisión del manuscrito y valiosas sugerencias aportadas.

* Laboratorio de Acarología, Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica

se recolectaron en el campus y alrededores de la Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, en San Pedro de Montes de Oca, San José, a 1200 msnm.

El estudio se efectuó bajo una temperatura ambiental promedio de 23.7°C y una humedad relativa promedio de 67%. El método utilizado en este estudio fue similar al empleado por Laing en 1968 y 1969 (8, 9, 10).

Se siguió el método de McMurtry y Scriven (11) para obtener huevos de edad conocida, el cual consiste en transferir varias docenas de hembras de la araña roja — en este caso *T. neocaledonicus*— a hojas limpias del sustrato (reina de la noche, en esta investigación). Esta se dejan ovipositar durante cuatro horas; posteriormente, los huevos obtenidos se recolectan y se trasladan a las celdas para ser estudiados.

Estudio de la biología

Se emplearon cámaras húmedas de vidrio de 5 cm de profundidad con tapa de 1.3 cm de diámetro. En cada una de ellas, se colocó una esponja de aproximadamente 10.3 cm de largo, 7.8 cm de ancho y 2.0 cm de grosor, humedecida con agua destilada; sobre ella se colocó una hoja de reina de la noche con el envés apoyado en la misma. Sobre la hoja se estableció un anillo de goma entomológica de aproximadamente 9 cm² de circunferencia, aplicado con una microaguja, el cual sirvió como barrera para mantener a los ácaros en confinamiento. En cada celda se incluyó un huevo de *T. pilosus*, de edad conocida. Las hojas permanecieron en buenas condiciones por un período de cinco a siete días, aproximadamente, siendo sustituidas por otras frescas.

Se suministró un promedio de 15 huevos de *T. neocaledonicus*, al día, hasta la conclusión de la etapa de preoviposición.

Se hicieron tres observaciones diarias, aproximadamente a las 6 am, 2 pm y 10 pm, durante el período que duró el ciclo de vida.

Proporción poblacional de los sexos o razón sexual

Para la determinación de poblaciones de machos y hembras se emplearon celdas de Munger modificadas (7, 14, 15). Para calcular la proporción de hembras a machos se recolectaron, de hojas de reina de la noche tomadas al azar, alrededor de 150 huevos del depredador; se colocaron en celdas que contenían una considerable población de arañitas rojas que sirvieron como alimento. Se llevaron hasta la madurez y posteriormente, se contó la proporción de machos y hembras

adultos existente. (Aponte, O. 1986. Comunicación personal. Venezuela).

Fuentes alternativas de alimento

1. Ingestión de polen

Se utilizó una placa Petri de vidrio de 9 cm de diámetro en la que se introdujo un disco de porcelana, sobre el que se demarcaron ocho celdas de 6 cm² cada una, con la goma entomológica. Se empleó el sustrato de porcelana para evitar que los ácaros pudiesen alimentarse de otra fuente que no fuese polen. Se utilizaron dos fuentes de polen: reina de la noche (*Brugmansia* spp.) y clavelón (*Hibiscus rosa-sinensis* L.). Se hicieron dos observaciones diarias.

2. Canibalismo y preferencias alimentarias por jugos de plantas

Se utilizaron las cámaras húmedas descritas en el estudio de la biología y se siguió la misma técnica que para el estudio de la misma. Para la prueba de canibalismo se incluyeron, en cada una de las celdas, representantes de todos los estados del ácaro, sin ninguna otra posible fuente de alimento que ellos mismos. En el ensayo de jugos de la planta como alternativa alimentaria, se colocaron, individualmente, huevos del depredador en cada celda utilizada y se hicieron anotaciones sobre el desarrollo biológico del organismo. Se efectuaron dos observaciones diarias.

Tabla de vida

Se siguió el mismo método usado para estudiar la biología, excepto que las celdas de confinamiento fueron de 24 cm², aproximadamente. Una vez que las deutoninfas mudaron al estado de hembra, se introdujo, en cada cámara, un macho durante 24 horas. Además, se suministró un promedio de 25 huevos diarios de la presa a cada una de las celdas, durante el período oviposicional de las hembras. Los huevos puestos por éstas se contaron y removieron diariamente para facilitar las observaciones. Se hizo una observación cada 24 horas. Para calcular la tabla de vida se siguió el método de Birch (2).

De los datos desprendidos de la biología se calculó la tasa intrínseca de incremento natural, usando la fórmula:

$$\sum e^{-r} m_{x_1} m_x = 1$$

en donde "e" es la base del logaritmo natural,

"r_m" es la tasa intrínseca de incremento natural,

- “x” es la edad de los individuos en días,
- “ l_x ” es la tasa de supervivencia de las hembras en una proporción de uno,
- “ m_x ” es el número de descendientes hembras producidos por hembra en el intervalo de edad “x”.

Los valores del exponente negativo de “ $e^{-r}m_x$ ” de este experimento frecuentemente se salen del ámbito dado en las tablas encontradas en la mayoría de los manuales matemáticos. Por esa razón, ambos lados de la ecuación se multiplican por un valor de e^K escogido al azar. Para este ensayo se escogió como K a 7; por lo tanto, se obtuvo:

$$e^7(\sum e^{-r}m_x^x l_x m_x) = e^7, \text{ o sea,}$$

$$\sum e^{7-r}m_x^x l_x m_x = 1096.63 \cong 1097$$

Los valores provisionales de r a dos lugares decimales se-sustituyeron en la fórmula hasta que los dos valores de la ecuación $e^{7-r}m_x^x l_x m_x$ encontrados, estuvieran inmediatamente arriba y abajo de 1097.

Luego, estos valores de $\sum e^{7-r}m_x^x l_x m_x$ se trazaron sobre el eje horizontal de la Fig 1 contra sus respectivos r_m provisionales en el eje vertical. Los dos puntos se unieron para dar una línea que intersectó la vertical del valor deseado de $\sum e^{7-r}m_x^x l_x m_x$ (1097). El punto de intersección da el r_m exacto a tres lugares decimales

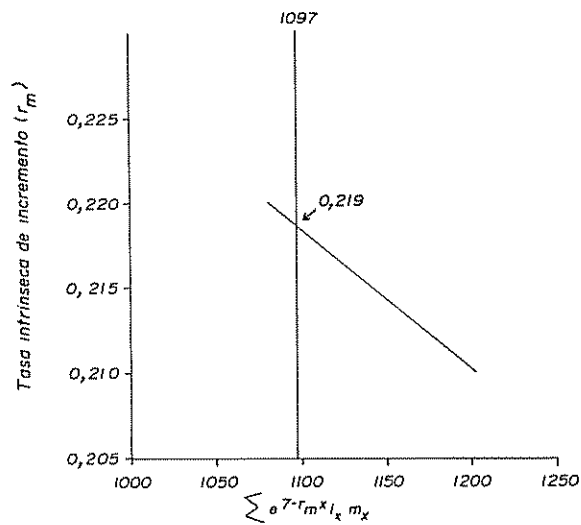


Fig 1 Determinación de la tasa intrínseca de incremento para *Typhlodromus pilosus* (ACARI: Phytoseiidae).

La tasa de reproducción neta se calculó como la suma de las respectivas columnas $l_x m_x$ (Cuadro 6). El lapso medio generacional se calculó mediante la fórmula:

$$T = \frac{\log_e R_0}{r_m}$$

La tasa finita de crecimiento se calculó con la fórmula:

$$\lambda = \text{antilog } r_m$$

RESULTADOS Y DISCUSION

Distribución de la población de *T. pilosus* en reina de la noche (*Brugmansia* spp.)

Los ejemplares de *T. pilosus* siempre se encontraron asociados con la arañita roja *Tetranychus neocaledonicus*, en la superficie abaxial de la hoja y en la adaxial cuando las poblaciones del tetraniquido fueron tan altas que se vieron obligados a invadirla. No se observaron ejemplares en alguna otra parte de la planta, como peciolos, ramas o flores. Estas observaciones fueron de tipo cualitativo.

T. pilosus se alimentó principalmente de huevos, excepto cuando los estados móviles de la presa dominaron, en cuyo caso lo hizo de éstos.

Biología

Huevo: es ovalado, amarillento y brillante, cuando está joven; al envejecer se tornó opaco.

Son depositados generalmente cerca de la vena central y las secundarias de las hojas; en ocasiones, se encuentran en los extremos de los tricomas o junto a las masas de huevos puestos por las arañitas rojas, sobre la tela. Cuando se suministró polen, los huevos fueron puestos sobre éste.

Eclosionó en 2.4 ± 0.3 días, si las larvas fueron machos y 2.3 ± 0.3 días si fueron hembras (Cuadro 1). Tanigoshi y McMurtry (17) informan que el también fitoseido *Typhlodromus floridanus* Muma presentó una duración de 2.9 días para la hembra y 2.7 días para el macho, a un ámbito de temperatura de 22-27°C y con una humedad relativa de 50-65%. Muma (13), en investigaciones realizadas con este último depredador, encontró que tanto el macho como la hembra emplearon una duración promedio de 1.9 días a una temperatura de 26.7°C, lo que se puede considerar como una respuesta lógica ya que, a mayor temperatura, los procesos biológicos se realizan más aceleradamente (5).

Cuadro 1. Duración de los estados inmaduros de *Typhlodromus pilosus* (ACARI: Phytoseiidae), en condiciones de laboratorio.

Sexo	Número observado	Duración (días)			
		Máximo	Mínimo	Promedio	Desviación estándar
Estado Inmaduro					
Huevo					
"Macho"	3	2.8	2.2	2.4	0.3
"Hembra"	12	2.8	1.8	2.3	0.3
Larva					
"Macho"	3	1.3	0.6	1.1	0.4
"Hembra"	8	1.7	1.0	1.2	0.2
Protoninfa					
"Macho"	3	1.4	1.0	1.1	0.2
"Hembra"	12	1.6	1.0	1.2	0.2
Deutoninfa					
"Macho"	3	1.6	1.0	1.3	0.3
"Hembra"	23	1.6	1.0	1.3	0.2
Todos los estados combinados					
"Macho"	3	6.1	5.8	5.9	0.1
"Hembra"	8	6.5	5.3	6.1	0.4

Larva: Al eclosionar el huevo, sale una larva que es completamente hialina y con tres pares de patas. Es bastante activa y se alimenta de huevos con gran avidez. El estado larval empleó un promedio de 1.2 ± 0.2 días para las hembras y 1.1 ± 0.4 días para los machos (Cuadro 1). La duración de este estado es muy semejante en la mayoría de los fitoseidos; *T. floridanus*, de acuerdo a Tanigoshi y McMurtry (17), utilizó un promedio de 1.27 días para las hembras y 1.21 días para los machos. En el ensayo de Muma (13), las larvas de ambos sexos emplearon alrededor de un día en su desarrollo.

Tanigoshi y McMurtry (17), observaron que las larvas de *T. floridanus* no se alimentan durante su desarrollo, lo que difiere notablemente con el comportamiento de *T. pilosus* que consumió un promedio de 2.5 huevos durante ese lapso (Cuadro 2).

Protoninfa: Cuando muda a este estado, presenta un tamaño similar al de la larva; es hialina, tiene cuatro pares de patas y su opistosoma se presenta un poco ahusado. Conforme el ácaro se alimenta, se vuelve amarillento y aumenta de tamaño. Antes de mudar al siguiente estado se vuelve inactiva, pero, puede activarse si es perturbada. El tiempo promedio de desarrollo para la protoninfa fue de 1.1 ± 0.2 días para los machos y de 1.2 ± 0.2 días para las hembras (Cuadro 1), consumiendo un promedio de 3.8 huevos de *T. neocaledonicus* durante este lapso (Cuadro 2). *T. floridanus* empleó un promedio de 2.20 días para las

hembras y 2.59 días para los machos; además, las primeras consumieron aproximadamente 9.06 huevos del ácaro tetraniquido *Oligonychus punicae* (Hirst) (17). Por su parte, Muma (13) informa que la duración promedio de la protoninfa de *T. floridanus* fue de 2.2 días para las hembras y de 1.8 días para los machos.

Deutoninfa: Es de color amarillo claro. Setas bien desarrolladas, pero más cortas que en el estado adulto; es muy activa.

Como se observa en el Cuadro 1, la duración promedio del estado deutoninfal fue de 1.3 ± 0.3 días y de 1.3 ± 0.2 días para machos y hembras, respectivamente; es en esta etapa en la que estas últimas consumieron un promedio de cuatro huevos de *T. neocaledonicus* (Cuadro 2). Tanigoshi y McMurtry (17) informan que *T. floridanus* tuvo una duración promedio de 1.98 días para las hembras y de 1.94 días para los machos, consumiendo las primeras un promedio de 9.25 huevos de *O. punicae*. Muma (13) determinó que *T. floridanus* empleó un promedio de 2.7 días para las hembras y 1.8 días para los machos.

Antes de alcanzar el estado adulto, *T. pilosus* entra en un periodo de inactividad, lo cual coincide con las observaciones que Tanigoshi y McMurtry realizaron para *T. floridanus* (17).

Cuadro 2. Número de huevos de *Tetranychus neocaledonicus* (ACARI: Tetranychidae) consumidos durante el desarrollo de los estados inmaduros de *Typhlodromus pilosus* (ACARI: Phytoseiidae), en condiciones de laboratorio.

Estado	Número observado	Número de huevos consumidos			
		Máximo	Mínimo	Promedio	Desviación estándar
Larva	8	5	1	2.5	1.4
Protoninfa	12	8	1	3.8	2.1
Deutoninfa	23	7	1	4.0	1.6
Total	8	11	7	8.6	1.6

El tiempo que transcurrió entre la deposición del huevo y la muda al estado adulto fue muy similar para ambos sexos; el macho empleó 5.9 ± 0.1 días y la hembra 6.1 ± 0.4 días (Cuadro 1), lo cual difiere considerablemente de las observaciones llevadas a cabo por Tanigoshi y McMurtry (17) para *T. floridanus*, que necesitó un promedio de 8.35 días para las hembras y 8.40 días para los machos. Muma (13) encontró que las hembras de *T. floridanus* emplearon 7.8 días y los machos 6.5 días.

Durante toda la etapa inmadura, las hembras de *T. pilosus* consumieron un promedio de 8.6 ± 1.6 huevos de *T. neocaledonicus* (Cuadro 2).

Macho: Es más pequeño que la hembra; esta diferencia se vuelve más notable cuando maduran. Es de color amarillo claro; presenta setas bien desarrolladas. Son capaces de aparearse inmediatamente después de que mudan a adulto. Emplearon aproximadamente cinco minutos en consumir un huevo y se alimentaron de un promedio de 1.2 huevos diarios, durante toda su etapa adulta.

Hembra: De mayor tamaño que la deutoninfa, es de color amarillo claro; su idiosoma es aplanado cuando está muy joven; se ensancha conforme madura hasta adquirir un tamaño máximo. Las setas son muy desarrolladas. Su cuerpo se oscurece con el tiempo; se vuelve de un color amarillo oscuro en las hembras más viejas. Al igual que el macho, tiene la capacidad de aparearse inmediatamente después de la última muda.

El periodo preoviposicional promedio en 14 hembras fue de 2.7 ± 1.2 días (Cuadro 3). Durante esta etapa, éstas consumieron 4.6 ± 1.6 huevos de *T. neocaledonicus* por día (Cuadro 5). En la investigación hecha por Tanigoshi y McMurtry (17) se encontró que el periodo preoviposicional de las hembras de *T. floridanus* fue de 3.23 días, como promedio, consumiendo una tasa media de 5.29 huevos de *O. punicea* por hembra por día.

Las hembras de *T. pilosus* ovipositaron durante 15.9 días como promedio (Cuadro 3), lapso durante el cual pusieron, cada una, aproximadamente 1.6 ± 0.6 huevos por día, con un promedio total de 22.8 huevos por hembra (Cuadro 4); además, consumieron un promedio de 5.8 ± 2.2 huevos diarios (Cuadro 5). Por su parte, Tanigoshi y McMurtry (17) determinaron que las hembras de *T. floridanus* pusieron un promedio de 1.97 huevos por hembra por día, con un promedio total de 41.44 huevos durante un periodo oviposicional promedio de 22.53 días.

Muma (13) informa que las hembras de *T. floridanus*, criadas en el laboratorio, pusieron de 16 a 45 huevos y un promedio total de 26.2 huevos, durante un periodo oviposicional de 1 a 2 semanas.

Las hembras ovipositantes de *T. pilosus* consumieron un promedio de 5.8 ± 2.2 huevos del tetránquido por día, empleando entre tres y ocho minutos en absorber un huevo. Las de *T. floridanus* se alimentaron de 12.19 ± 1.28 huevos por día (17).

Cuadro 3. Duración de varios periodos de las "hembras adultas" de *Typhlodromus pilosus* (ACARI: Phytoseiidae) en condiciones de laboratorio.

Periodo	Número observado	Duración (días)			
		Máximo	Mínimo	Promedio	Desviación estándar
Preoviposición	14	4.9	1.4	2.7	1.2
Oviposición	18	43.0	6.0	15.9	—
Adulto	18	85.0	8.0	23.4	—

Cuadro 4. Número de huevos puestos por *Typhlodromus pilosus* (ACARI: Phytoseiidae), alimentados con huevos de *Tetranychus neocaledonicus* (ACARI: Tetranychidae), en condiciones de laboratorio.

	Número hembras	Número de huevos			Desviación estándar
		Máximo	Mínimo	Promedio	
Número total por hembra	18	44.0	3.0	22.8	—
No /hembra/día	18	2.5	0.5	1.6	0.6

Las hembras no apareadas de *T. pilosus* no ovipositaron, lo cual concuerda con las observaciones hechas por Chant, Laing, McMurtry y Scriven, Muma y Tanigoshi y McMurtry (3, 8, 9, 11, 12, 17).

Durante el período de postoviposición consumieron un promedio de 1.6 ± 0.5 huevos de la presa por día (Cuadro 5). Las hembras vírgenes consumieron aproximadamente 1.3 huevos diarios durante toda su etapa adulta, cantidad muy similar al consumo de las hembras apareadas postovipositoras, por lo que es posible que el aumento en presa consumida, durante la etapa de oviposición sea utilizado en la producción de huevos, lo cual ha sido sugerido por McMurtry, Huffaker y van de Vrie (12). Las hembras de *T. floridanus* se alimentaron de 2.72 ± 0.76 huevos por día en esta etapa (17).

Proporción poblacional de los sexos o razón sexual

En una muestra de 109 individuos, se determinó que 79 fueron hembras y 30 machos para una proporción de 2.7:1. La proporción encontrada por Tanigoshi y McMurtry (17) para *T. floridanus*, presentó una relación más cercana entre hembras y machos: 1.8:1.

Fuentes alternativas de alimento

1. Ingestión de polen

a) Reina de la noche (*Brugmansia* spp.):

Varios estados de *T. pilosus* fueron aislados en celdas con solamente polen como alimento. Nunca se observó que se alimentaran del mismo; ninguno vivió más allá de dos días. Algunas hembras ovíplenas depositaron uno o dos huevos el primer día en que fueron incluidas en la celda. No se observó que ocurriese apareamiento en este sustrato.

b) Clavelón (*Hibiscus rosa-sinensis* L.)

Tampoco hubo respuesta positiva. Se presentó un comportamiento similar al caso anterior.

2. Prueba de jugos de la planta

Algunas larvas lograron alcanzar el estado de deutoninfa en el cual murieron. Las hembras adultas ovíplenas, como en las pruebas de polen, pusieron de uno a dos huevos durante la etapa en que permanecieron vivas. Vivieron un máximo de 5.42 días, mientras que los machos duraron un máximo de 6.04 días.

Presenta una mejor respuesta que la ingestión de polen, pero, no lo suficiente para que sea considerado como un alimento trascendente para mantener vivas las poblaciones del depredador por tiempos prolongados, en ausencia de su presa preferida, las arañitas rojas.

Muma (13) informa que las hembras de *T. floridanus* sobreviven pero no ovipositan cuando se alimentan de savia, miel y polen de cítricos, ligamaza de in-

Cuadro 5. Alimentación de la "hembra adulta" de *Typhlodromus pilosus* (ACARI: Phytoseiidae) sobre huevos de *Tetranychus neocaledonicus* (ACARI: Tetranychidae), en condiciones de laboratorio.

Período	Número observado	Número promedio de días observado	Huevos comidos/ ♀ /día			Desviación estándar
			Máximo	Mínimo	Promedio	
Preoviposición	14	2.8	8.0	2.7	4.6	1.6
Oviposición	18	15.9	9.8	2.2	5.8	2.2
Postoviposición	6	10.4	2.2	1.0	1.6	0.5

sectos homópteros y otros alimentos suplementarios, lo cual difiere radicalmente con el comportamiento mostrado por *T. pilosus* en este ensayo, al menos, en los posibles alimentos suplementarios evaluados.

3. Canibalismo

No se observó. Tanto las formas inmaduras como los adultos murieron a los pocos días, aparentemente de hambre, lo que se asemeja bastante al comportamiento de *T. floridanus* que presentó canibalismo en muy bajo grado (17).

Apareamiento

Es estrictamente necesario para ovipositar y su duración es variable. Se observó a individuos que copularon desde unos pocos hasta 72 minutos, que fue lo máximo observado.

Longevidad

Presentaron una longevidad considerable. El macho pudo sobrevivir casi 60 días alimentándose de 1.2 huevos diarios, aproximadamente. Por su parte, las hembras presentaron una longevidad mayor; hubo algunas que vivieron entre 60 y 90 días alimentándose de un promedio de 1.6 huevos en la etapa de postoviposición.

Tabla de vida

En el Cuadro 6, en que se presentan los valores de las tablas de vida y de fecundidad de *T. pilosus*, se aprecia que la tasa de reproducción neta de este depredador fue de 16.42. En la Fig. 1 se observa el valor real de la tasa intrínseca de incremento para este ácaro que fue de 0.219 individuos por hembra por día. Además, presentó un lapso generacional de 12.78.

Por esta razón, se puede indicar que *T. pilosus* podría incrementarse 16.42 veces en un lapso generacional de 12.78 días, bajo las condiciones en que se efectuaron las observaciones, con una tasa intrínseca de incremento de 0.219 individuos por hembra por día. *T. floridanus*, que se estudió bajo condiciones ambientales diferentes, podría incrementarse 22.60 veces en un lapso generacional de 19.60 días con una tasa intrínseca de incremento de 0.159 individuos por hembra por día (17).

La tasa finita de crecimiento fue de 1.24, lo cual indica que la población de este ácaro se multiplicará 1.24 veces en un día.

Al analizar los resultados obtenidos en esta investigación no se puede concluir que *T. pilosus* tenga un alto potencial de depredación, pero si representan un buen conocimiento de la biología y comportamiento de este depredador. Por lo tanto, es necesario realizar más investigaciones principalmente a nivel de laboratorio y de campo, al cabo de las cuales se podrá determinar, con mayor certeza, la capacidad depredadora de *T. pilosus* y si es posible recomendarlo para utilización en programas de combate biológico.

Cuadro 6. Tabla de vida del ácaro acarofágido *Typhlodromus pilosus* (ACARI: Phytoseiidae) a una temperatura media de 23.7°C y a una humedad relativa de 67%, en condiciones de laboratorio.

Edad (días)	Proporción de hembras vivas a la edad x	Progenie hembra producida por hembra	
x	l_x	m_x	$l_x m_x$
0-7	1.00	0.00	0.00
8	1.00	1.32	1.32
9	1.00	1.36	1.36
10	1.00	1.52	1.52
11	1.00	1.20	1.20
12	1.00	1.20	1.20
13	1.00	0.96	0.96
14	0.89	1.17	1.04
15	0.89	0.81	0.72
16	0.67	1.20	0.80
17	0.61	1.11	0.68
18	0.55	1.08	0.59
19	0.50	1.12	0.56
20	0.50	1.28	0.64
21	0.44	1.08	0.47
22	0.39	0.82	0.32
23	0.33	0.96	0.32
24	0.28	0.86	0.24
25	0.22	0.90	0.20
26	0.17	0.96	0.16
27	0.17	0.48	0.08
28	0.17	0.48	0.08
29	0.17	1.44	0.24
30	0.17	0.96	0.16
31	0.17	1.20	0.20
32	0.17	0.96	0.16
33	0.17	0.96	0.16
34	0.17	0.72	0.12
35	0.17	0.72	0.12
36	0.17	0.48	0.08
37	0.17	0.24	0.04
38	0.17	1.20	0.20
39	0.17	0.24	0.04
40	0.17	0.72	0.12
41	0.17	0.48	0.08
42	0.17	0.72	0.12

$$R_0 = 16.42$$

LITERATURA CITADA

1. AGUILAR, H. 1986. Biología y ecología de *Typhlodromus pilosus* Chant (ACARI: Phytoseiidae) en el Valle Central de Costa Rica e importancia de los ácaros fitoseidos como agentes reguladores de las poblaciones de ácaros fitoparásitos. Tesis Ing. Agr. San José, Universidad de Costa Rica, Facultad de Agronomía 81 p.
2. BIRCH, L.C. 1948. The intrinsic rate of natural increase of an insect population. *Journal of Animal Ecology* 17:15-26.
3. CHANT, D.A. 1959. Phytoseiid mites (Acarina: Phytoseiidae) Part 1. Bionomics of seven species in southeastern England. Part 2. A taxonomic review of the family Phytoseiidae, with description of 38 new species. *The Canadian Entomologist* 91:5-164.
4. DORMOND, M. 1982. Eficacia de siete acaricidas en el combate químico de la araña roja (*Tetranychus* spp) en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) Tesis Ing. Agr. San José, Universidad de Costa Rica, Facultad de Agronomía 81 p.
5. FORCE, D.C.; MESSENGER, P.S. 1964. Fecundity, reproductivity rates, and innate capacity for increase of three parasites of *Therioaphis maculata* (Buckton). *Ecology* 45(4):706-715.
6. HOYT, S.C.; CALIAGIRONE, L.E. 1976. The developing programs of integrated control of pests of apples in Washington and peaches in California. In *Biological Control* Ed. by C.B. Huffaker. New York, Plenum Press p. 395-421.
7. HUFFAKER, C.B. 1948. An improved cage for work with small insects. *Journal of Economic Entomology* 4(4):648-649.
8. LAING, J.E. 1968. Life history and life table of *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot. *Acarologia* 10(4):578-588.
9. LAING, J.E. 1969. Life history and life table of *Meta-seiulus occidentalis*. *Annals of the Entomological Society of America* 62(5):978-982.
10. LAING, J.E. 1969. Life history and life table of *Tetranychus urticae* Koch. *Acarologia* 11(1):32-42.
11. McMURTRY, J.A.; SCRIVEN, G.T. 1964. Biology of the predaceous mite *Typhlodromus rickeri* (Acarina: Phytoseiidae). *Annals of the Entomological Society of America* 57(3):362-367.
12. McMURTRY, J.A.; HUFFAKER, C.B.; VRIE, M. VAN DE. 1970. Ecology of tetranychid mites and their natural enemies: A review. I. Tetranychid enemies: their biological characters and the impact of spray practices. *Hilgardia* 40(11):331-390.
13. MUMA, M.H. 1970. Natural control potential of *Galenodromus floridanus* (Acarina: Phytoseiidae) on Tetranychidae on Florida citrus trees. *The Florida Entomologist* 53(2):79-88.
14. MUNGER, F. 1942. A method for rearing citrus thrips in the laboratory. *Journal of Economic Entomology* 35(3):373-375.
15. MUNGER, F.; GILMORE, J.E. 1964. Equipment and techniques used in rearing and testing the citrus red mite. In *Advances in Acarology*. Ed. by J.A. Naegele. Ithaca, New York, Cornell University Press v. 1, p. 157-168.
16. SALAS, L.A. 1978. Algunas notas sobre las arañas rojas (Tetranychidae: Acari) halladas en Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 2(1):47-59.
17. TANIGOSHI, I.K.; McMURTRY, J.A. 1977. The dynamics of predation of *Stethorus picipes* (Coleoptera: Coccinellidae) and *Typhlodromus floridanus* on the prey *Oligonychus punicae* (Acarina: Phytoseiidae, Tetranychidae). I. Comparative life history and life table studies. *Hilgardia* 45(8):237-261.

Actividad Nitrato Reductasa en Hoja, Tallo Raíz y Nódulo de *Lotus corniculatus* en Simbiosis con *Rhizobium loti*¹

J. Monza*, M.J. Delgado**, E.J. Bedmar**

ABSTRACT

The nitrogenase and hydrogen uptake activities of *Rhizobium loti* strains U226 and T1 were studied in symbiosis with *Lotus corniculatus* L. var. Ganador. Leaf, stem, root and nodule nitrate reductase (NR) activities were also determined as well as the contribution of each plant organ to the total plant NR activity. There was no difference in nitrogenase activity (measured as acetylene-dependent ethylene production) between strains U226 and T1 and neither of them expressed hydrogen uptake activity (determined amperometrically). In plants that were only N₂-dependent, the in vivo leaf, stem, root and nodule NR activities of plants inoculated with strain T1 were higher than those of plants inoculated with strain U226, regardless of the presence or the absence of nitrate in the incubation mixtures. When plants were treated with 5 mM KNO₃, there was no difference between root NR activity of plants inoculated with either strain. However, leaf, stem and nodule NR activities were greater in plants inoculated with strain T1. In plants not treated with nitrate, leaf NR activity was responsible for 45% of the total plant NR activity, while those of stem, root and nodule accounted for 28.5%, 22% and 4.5%, respectively. When plants were treated with nitrate, the stem was the most active organ in nitrate reduction with 52% of the total plant NR activity, followed by root, stem and nodule with 31%, 14.5% and 2.5%, respectively. The total reduced nitrogen content of plants inoculated with strain T1 was 1.6 times higher than that of plants inoculated with strain U226. These results indicate that plants inoculated with strain T1 had a more efficient nitrate metabolism than plants inoculated with strain U226.

COMPENDIO

Se ha estudiado la actividad nitrogenasa e hidrogenasa de las razas U226 y T1 de *Rhizobium loti* en simbiosis con *Lotus corniculatus* L., var. Ganador. También, se ha determinado la actividad nitrato reductasa (NR) de hoja, tallo, raíz y nódulo de plantas de *Lotus*, así como la contribución de cada uno de estos órganos a la actividad NR total de la planta. No se encontraron diferencias en la actividad nitrogenasa (medida como reducción del acetileno a etileno) entre las razas U226 y T1 y ninguna de las dos expresó actividad hidrogenasa (determinada amperométricamente). En plantas crecidas, dependiendo exclusivamente de la fijación de N₂, la actividad NR in vivo de las hojas, tallos, raíces y nódulos de las plantas inoculadas con la raza T1 fue superior a la de las plantas inoculadas con la raza U226, independientemente de que los ensayos de actividad se realizaran en presencia o en ausencia de nitrato en las mezclas de incubación. Cuando las plantas se trataron con 5 mM de NO₃K, no hubo diferencias en la actividad NR de las raíces de las plantas inoculadas con las razas U226 y T1. Sin embargo, la actividad NR de las hojas, tallos y nódulos fue mayor en las plantas inoculadas con esta raza. En plantas no tratadas con nitrógeno combinado, la actividad NR de las hojas contribuyó con un 45% al total de la actividad NR de la planta, mientras que la del tallo, raíz y nódulos contribuyeron con un 28.5%, 22% y 4.5%, respectivamente. En plantas tratadas con nitrato, el tallo fue el órgano más activo en la reducción del mismo, aportando el 52% de la actividad NR total de la planta, seguido de la raíz con un 31%, las hojas con un 14.5% y los nódulos con un 2.5%. El contenido en nitrógeno total reducido de las plantas inoculadas con la raza T1 fue 1.4 veces mayor que el de las plantas inoculadas con la raza U226. Estos resultados indican que las plantas inoculadas con la raza T1 tuvieron un metabolismo del nitrato más efectivo que el de las inoculadas con la raza U226.

¹ Recibido para publicación el 18 de agosto 1988.

Los autores desean expresar su agradecimiento a las siguientes personas e instituciones: Dr. M. Chamber, por su colaboración en la determinación de actividad hidrogenasa. Este trabajo fue financiado por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (C.I.C.Y.T.), Proyecto No. BF 87-003. Al Instituto de Cooperación Iberoamericana (I.C.I.), por haber financiado al primer autor su permanencia en España para realizar la investigación que sirvió de base para escribir el presente trabajo.

* Cátedra de Bioquímica. Facultad de Agronomía Montevideo. Uruguay.

** Departamento de Microbiología. Estación Experimental del Zaidín, C.S.I.C. 18008-Granada. España

INTRODUCCION

Las leguminosas son únicas entre las plantas superiores porque pueden utilizar tanto el nitrógeno atmosférico (N₂), como el nitrato (NO₃⁻) presente en la solución del suelo para su crecimiento y desarrollo

La reducción del N₂ a amonio (NH₄⁺) está catalizada por la enzima nitrogenasa que, simultáneamente, reduce protones (H⁺) a hidrógeno (H₂) (7). La producción de hidrógeno por los nódulos de las leguminosas representa una pérdida de energía y poder reductor que disminuye la eficacia de la fijación de N₂

(11) Algunas especies de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* han desarrollado un sistema enzimático independiente, conocido como hidrogenasa (sistema Hup), capaz de oxidar todo o parte del H_2 producido por la nitrogenasa, lo que resulta, a su vez en la recuperación de electrones que pueden ser utilizados por la nitrogenasa o destinados a la producción de ATP (8, 9).

La asimilación de nitrato ocurre en dos etapas. La primera de ellas está catalizada por la enzima nitrato reductasa (NR), que reduce en nitrato a nitrito (NO_2^-). Posteriormente, el nitrito es reducido a amonio por la nitrito reductasa (NiR). A diferencia de la nitrogenasa, que sólo se encuentra en los bacteroides, la NR puede localizarse además en las hojas, tallos y raíces de la mayoría de las plantas, incluyendo las leguminosas (1).

A diferencia de otras simbiosis, como las que se establecen entre *Medicago*, *Trifolium*, *Phaseolus*, *Glycine*, etc y sus microsimbiontes específicos, más estudiadas en sus aspectos fisiológicos, bioquímicos, genéticos y agronómicos, son muy escasos los datos que se poseen sobre la asociación *Lotus-Rhizobium loti*. *R. loti* es una raza de rápido crecimiento capaz de infectar no sólo a leguminosas del género *Lotus*, sino también a *Lupinus*, *Ornithopus* y *Anthyllis* (14). En Uruguay, se cultiva *Lotus corniculatus* tanto en condiciones de monocultivo como en asociación con *Festuca arundinacea* y *Lolium multiflorum*.

Estas praderas naturales constituyen la base para la alimentación de ganado y la producción de carne, leche y lana.

Este trabajo se inició con el objeto de estudiar las actividades nitrogenasa e hidrogenasa de *R. loti* en simbiosis con *L. corniculatus*. También, se ha comparado la actividad nitrato reductasa de hoja, tallo, raíz y nódulo de plantas de *L. corniculatus* inoculadas con las razas U226, inóculo comercial, y T1, aislada de un suelo nativo de Uruguay.

MATERIALES Y METODOS

Plantas y microorganismos

En el estudio se utilizó *Lotus corniculatus*, var. Ganador. Las semillas se esterilizaron con alcohol (96% v/v) durante 3 min; se lavaron abundantemente con agua estéril y se germinaron en cajas de Petri que contenían papel de filtro humedecido. Las plántulas se colocaron en jarras Leonard (cinco plantas por jarra) provistas de la solución mineral nutritiva descrita por Rigaud y Puppo (22), carente de nitrógeno.

En el momento de la siembra, cada plántula se inoculó, aisladamente, con 1 ml (10^8 células de una suspensión de *R. loti*, razas U226 y T1). Las plántulas se cultivaron en cámaras de crecimiento controlado bajo las siguientes condiciones: ciclo día/noche de 16/8 h, 23/16 °C, 50% humedad relativa y una intensidad luminosa ($400-700$ nm) de $500 \mu \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$.

Para los estudios de actividad nitrato reductasa en plantas tratadas con nitrato, la solución nutritiva de las jarras Leonard fue sustituida cinco días antes de la toma de muestras por otra idéntica adicionada de 5 mM de NO_3K .

La raza U226 es un inoculante comercial utilizado en Uruguay (23), y la raza T1 fue aislada originalmente de un suelo de la región de Tacuarembó (Uruguay). Las bacterias se cultivaron asimbióticamente en un medio que contenía manitol, extracto de levadura y triptona.

Estudios fisiológicos

La actividad nitrogenada se ensayó mediante la técnica de la reducción del acetileno a etileno. Las plantas con las raíces noduladas se colocaron en tubos provistos de tapón de rosca perforable, sustituyéndose el 10% del volumen interior del tubo por acetileno. El etileno producido se determinó por cromatografía gaseosa a los 8 y 18 min, en las condiciones previamente descritas (5).

La actividad hidrogenasa de *R. loti* se determinó registrándose amperométricamente el consumo de H_2 cuando a la suspensión de bacteroides se le suministró H_2 y un aceptor final de electrones, de acuerdo con la metodología descrita por López *et al.* (16). Los bacteroides se aislaron de los nódulos según Emerich *et al.* (10), pero, en condiciones de aerobiosis para impedir la producción de H_2 por la nitrogenasa.

La actividad nitrato reductasa se analizó mediante la técnica descrita por Ligeró *et al.* (15). Para ello, 0.20 g de nódulos enteros y de hojas, tallos y raíces homogéneamente troceados se colocaron en tubos que contenían 4 ml de buffer fosfato potásico 50 mM, pH 7.5, adicionado de EDTA 1 mM, propanol 1% (v/v) y NO_3K 50 mM (ensayos + NO_3^-). La infiltración de los tejidos se realizó efectuando un vacío de 40 cm de Hg (50 kPa) durante 10 min y posterior descompresión. Esta operación se repitió dos veces. Los tejidos infiltrados se incubaron en oscuridad, sin agitación, a 30°C y se tomaron varias alícuotas. Los valores de actividad NR que se indican en el capítulo de Resultados corresponden a 60 min de incubación, tiempo durante el cual la liberación de nitrito al medio fue lineal. La producción de nitrito se determinó

en alícuotas de 0.5 ml mediante la reacción de diazotación descrita por Hageman y Hucklesby (12), midiéndose la absorbancia a 540 nm después de 20 min de la adición de los reactivos. En ensayos paralelos, la actividad NR también se determinó en mezclas de incubación carentes de NO_3K (ensayos *in vivo* - NO_3). Estos ensayos están directamente relacionados con los niveles internos de nitrato y se consideran como la mejor determinación de la capacidad de un tejido para reducir nitrato *in situ* (13, 21). Los ensayos de actividad NR en presencia de nitrato se consideran indicadores de la capacidad de un tejido vegetal para reducir nitrato cuando el sustrato no es limitante, y se relacionan con la actividad NR medida *in vitro* (1, 6, 25).

La actividad NR total de la planta se calculó multiplicando la actividad/g peso fresco de cada órgano por el peso fresco total de cada órgano analizado.

Todos los experimentos se realizaron a los 45 días después de la imbibición de las semillas. El contenido en nitrógeno reducido total se determinó mediante análisis Kjeldahl.

RESULTADOS

En el Cuadro 1 se presentan los resultados correspondientes a la actividad nitrogenasa de las razas U226 y T1 de *R. loti* en simbiosis con plantas de *L. corniculatus* var. Ganador. No se observaron diferencias significativas en los valores de reducción de acetileno a etileno entre ambas razas. En los dos casos, la adición de 5 mM de KNO_3 a la solución mineral nutritiva disminuyó la actividad nitrogenasa entre un 75% y un 72% para las razas U226 y T1, respectivamente (Cuadro 1).

Para establecer la presencia o ausencia de actividad hidrogenasa, se determinó la capacidad de incorpora-

Cuadro 1. Actividad nitrogenasa de las razas U226 y T1 de *R. loti* en simbiosis con *L. corniculatus* var. Ganador. Las plantas se trataron o no con 5 mM de NO_3K . Los valores representan la media \pm SE de seis repeticiones.

Raza de <i>Rhizobium</i>	Actividad nitrogenasa ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{g}$ peso seco de nódulo)	
	Plantas - KNO_3	Plantas + KNO_3
	U226	8.2 \pm 0.6
T1	8.7 \pm 0.6	2.4 \pm 0.5

SL: error estándar

ción de H_2 por los bacteroides aislados de los nódulos formados por las razas U226 y T1. En ningún caso, los bacteroides fueron capaces de utilizar hidrógeno como aceptor final de electrones, según los resultados obtenidos por la técnica amperométrica empleada en este estudio. En estos experimentos se utilizó como control positivo una suspensión de bacteroides de *Bradyrhizobium japonicum*, raza 311b122 (fenotipo Hup⁺, 17).

En el Cuadro 2 se indican los valores de actividad NR de las hojas, tallos, raíces y nódulos de *L. corniculatus* cuando las plantas crecieron en ausencia de nitrato. En plantas inoculadas con la raza U226 no se encontraron diferencias significativas en la actividad de los diferentes tejidos vegetales utilizados, independientemente de la presencia o ausencia de NO_3K en las mezclas de incubación. Sin embargo, en plantas inoculadas con la raza T1, la actividad NR de tallos y nódulos fue superior cuando las mezclas de incubación contenían NO_3K . No se observaron diferencias en hojas y raíces cuando la actividad NR se ensayó en presencia y en ausencia de NO_3K . La actividad NR de las hojas, tallos, raíces y nódulos de las plantas inoculadas con la raza T1 fue, en todos los casos, superior a la de las plantas inoculadas con la raza U226 (Cuadro 2).

Cuando las plantas fueron tratadas con NO_3K (Cuadro 2), la actividad NR de los distintos tejidos vegetales fue superior a las encontradas cuando las plantas crecieron dependiendo exclusivamente de la fijación de N_2 (Cuadro 2).

Cuadro 2. Actividad nitrato reductasa de hoja, tallo, raíz y nódulo de *L. corniculatus*, var. Ganador, en simbiosis con las razas U226 y T1 de *R. loti*. Las plantas crecieron en ausencia de KNO_3 . Los ensayos de actividad NR se realizaron en presencia y en ausencia de 50 mM de KNO_3 en las mezclas de incubación. Los valores representan la media \pm SE de tres repeticiones.

Raza de <i>Rhizobium</i>	Mezcla de incubación	Actividad nitrato reductasa ($\text{nmol NO}_2^-/\text{g}$ peso fresco)			
		Hoja	Tallo	Raíz	Nódulo
U226	- KNO_3	24 \pm 2	24 \pm 3	23 \pm 3	12 \pm 2
U226	+ KNO_3	24 \pm 1	25 \pm 3	25 \pm 3	10 \pm 1
T1	- KNO_3	46 \pm 3	34 \pm 4	42 \pm 5	35 \pm 5
T1	+ KNO_3	45 \pm 4	50 \pm 7	39 \pm 5	54 \pm 6

SL: error estándar

Cuadro 3. Actividad nitrato reductasa de hoja, tallo, raíz y nódulo de *L. corniculatus* var. Ganador, en simbiosis con las razas U226 y T1 de *R. loti*. Las plantas se trataron con 5 mM de KNO_3 . Los ensayos de actividad se realizaron en presencia y en ausencia de 50 mM de KNO_3 en las mezclas de incubación. Los valores representan la media \pm SE de tres repeticiones.

Raza de <i>Rhizobium</i>	Mezcla de incubación	Actividad nitrato reductasa ($\text{nmol NO}_2^-/\text{g}$ peso fresco)			
		Hoja	Tallo	Raíz	Nódulo
U226	- KNO_3	112 \pm 7	656 \pm 16	577 \pm 31	121 \pm 14
U226	+ KNO_3	118 \pm 10	746 \pm 28	573 \pm 30	187 \pm 12
T1	- KNO_3	160 \pm 12	744 \pm 31	580 \pm 29	144 \pm 13
T1	+ KNO_3	163 \pm 16	817 \pm 35	576 \pm 27	207 \pm 16

SE: error estándar

La actividad NR de las raíces fue similar en plantas inoculadas con las razas U226 y T1, tanto en presencia como en ausencia de NO_3K en las mezclas de incubación (Cuadro 3)

En hojas, tallos y nódulos, la actividad NR fue superior en las plantas inoculadas con la raza T1, respecto a las inoculadas con la raza U226 (Cuadro 3). Independientemente de la raza empleada para la inoculación, la actividad NR de las hojas y raíces fue similar en presencia y en ausencia de NO_3K en las mezclas de incubación. Sin embargo, la actividad de los tallos y nódulos fue superior cuando las determinaciones se realizaron en mezclas de incubación que contenían NO_3K (Cuadro 3)

En el Cuadro 4 se muestran los datos correspondientes a la distribución de la actividad NR total en plantas de *L. corniculatus* tratadas con y sin nitrato. En plantas crecidas en ausencia de NO_3K , la actividad NR se distribuyó en el orden siguiente: hojas > tallo > raíz > nódulo. Sin embargo, la adición de NO_3K disminuyó la actividad NR de las hojas en un 32%, al mismo tiempo que se incrementó la del tallo en un 82% y la de la raíz en un 40%

El contenido en nitrógeno total reducido de plantas de *L. corniculatus* inoculadas con las razas U226 y T1 de *R. loti* se presentan en el Cuadro 5. La inoculación con la raza T1 aumentó la cantidad de este elemento alrededor del 40% con respecto a las plantas inoculadas con la raza U226.

DISCUSION

En *Rhizobium loti* se ha demostrado que la capacidad de algunas razas para formar simbiosis efectivas está relacionada con su resistencia a las flavonas (19,

20). Las razas U226 y T1 utilizadas en este estudio fueron capaces de formar nódulos activos como lo indican los datos de actividad de reducción de acetileno a etileno que se presentan en el Cuadro 1

No se detectó actividad hidrogenasa en ninguna de las dos razas estudiadas. En este sentido, las razas U226 y T1 se comportan como las razas, hasta ahora estudiadas, de *R. trifolii*, *R. meliloti* y *R. phaseoli*, donde no se ha puesto de manifiesto la capacidad de oxidar el H_2 producido por la nitrogenasa (11). Estos mismos autores han presentado datos sobre la distribución de la presencia de actividad hidrogenasa en diversas especies de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (11). Sin embargo, la posibilidad de que las razas U226 y T1 puedan expresar dicha actividad, no debe

Cuadro 4. Distribución de la actividad nitrato reductasa total en plantas de *L. corniculatus* var. Ganador, en simbiosis con las razas U226 y T1 de *R. loti*. Las plantas se trataron o no con 5 mM de KNO_3 . Los ensayos de actividad se realizaron en presencia y en ausencia de 50 mM de KNO_3 en las mezclas de incubación. Los valores representan el porcentaje de actividad correspondiente a cada tejido vegetal y son la media de las actividades obtenidas en cada una de las simbiosis establecidas.

Tratamiento	Mezcla de incubación	Actividad nitrato reductasa (%)			
		Hoja	Tallo	Raíz	Nódulo
Plantas - KNO_3	- KNO_3	44	30	23	3
Plantas - KNO_3	+ KNO_3	46	27	21	6
Plantas + KNO_3	- KNO_3	15	51	32	2
Plantas + KNO_3	+ KNO_3	14	53	30	3

eliminarse ya que las plantas hospedadoras pueden alterar la expresión de la actividad hidrogenasa del microsimbionte (4)

Los datos del Cuadro 2 indican que las hojas, tallos, raíces y nódulos de las plantas de *L. corniculatus* que crecieron dependiendo exclusivamente de la fijación de N_2 acumularon nitrito en el medio. Estos ensayos *in vivo* demostraron, además, que los diferentes tejidos vegetales de las plantas inoculadas con la raza T1 expresaron mayor actividad NR que los de las plantas inoculadas con la raza U226, tanto en presencia como en ausencia de nitrato en las mezclas de incubación. Otros autores también han encontrado acumulación de nitrito en tejidos vegetales de plantas de *Glycine*, *Medicago* y *Phaseolus* cuando se cultivaron en ausencia de nitrato (24, 25, 26).

La mayor capacidad para reducir nitrato de los tejidos de las plantas inoculadas con la raza T1, respecto a las inoculadas con la raza U226, también se puso de manifiesto cuando las plantas fueron tratadas con nitrato, excepto en el caso de la raíz (Cuadro 3). La NR de raíz es inducible por sustrato (5) y por tanto, es posible que esta ausencia de diferencias sea debida a que el nivel de inducción de la enzima fue similar en las raíces de las plantas inoculadas con las razas T1 y U226.

Hay que señalar, por otra parte, que tanto en plantas inoculadas con la raza T1 como con la U226, la actividad NR de hoja encontradas en los ensayos + NO_3^- fue similar a la de los ensayos - NO_3^- (Cuadro 3). Este hecho sugiere que, en las condiciones experimentales empleadas, bien el nitrato o el poder reductor actuó como factor limitante. Nuestros resultados parecen indicar que el factor limitante fue el nitrato ya que la presencia de éste en la solución mineral donde crecieron las plantas, disminuyó la proporción de actividad NR de hoja en un 32% respecto a la de las plantas crecidas en ausencia de nitrógeno combinado (Cuadro 4). Estos datos indican que, en presencia de nitrato, la mayoría de la actividad NR se localiza en el tallo y no en las hojas, como ocurrió cuando las plantas crecieron en ausencia de nitrato. Por lo tanto, aunque el nitrato sea absorbido por la raíz, en su mayor parte fue exportado vía xilema hasta el tallo donde ocurrió su reducción. Consecuentemente, el nitrato disponible para ser reducido en las hojas disminuyó drásticamente. La importancia del tallo por su

contribución al metabolismo nitrogenado de las leguminosas ha sido puesto de manifiesto recientemente (1, 2, 27). Estos mismos autores (1) han comprobado, respecto al metabolismo del nitrato, que las leguminosas de origen templado se caracterizan porque, en presencia de nitrato, la proporción de actividad NR correspondiente al tallo, en relación con la actividad NR total de la planta, se incrementa considerablemente respecto a la de la raíz. Sin embargo, las leguminosas de origen tropical se caracterizan porque la proporción de actividad NR en tallo y raíz es relativamente independiente de la fertilización nitrogenada.

En *L. corniculatus*, la presencia de nitrato disminuyó la proporción de actividad NR de hoja y aumentó la de tallo y raíz. Este incremento fue mayor en el tallo (82%) que en la raíz (41%) (Cuadro 4). Hay que tener en cuenta, sin embargo, que la distribución de actividad NR de los diferentes tejidos vegetales puede ser alterada tanto por el genotipo de la leguminosa hospedadora como por la inoculación con *Rhizobium* (18). Esto podría explicar por qué otros autores encontraron que la capacidad de reducir nitrato en *L. corniculatus* se encontraba fundamentalmente en la raíz de plantas no noduladas (18).

Aunque de los resultados de este estudio puede concluirse que la inoculación con la raza T1 de *R. loti* incrementó la actividad NR y el contenido en nitrógeno (Cuadro 5) de *L. corniculatus*, respecto a las inoculadas con la raza U226, son necesarios posteriores estudios de tipo agronómico para comprobar la superioridad de la raza T1 en condiciones de cultivos naturales.

Cuadro 5. Efecto de la inoculación con las razas U226 y T1 sobre el contenido en nitrógeno (N) total reducido de plantas de *L. corniculatus* var. Ganador. Los valores representan la media \pm SE de tres repeticiones.

Raza de <i>R. loti</i>	Contenido en N (%)
U226	3.19 \pm 0.06
T1	4.48 \pm 0.08

SE: error estándar.

LITERATURA CITADA

1. ANDREWS, M. 1986. The partitioning of nitrate assimilation between root and shoot of higher plants. *Plant and Cell Environment* 9:511-519.
2. ANDREWS, M.; SUTHERLAND, J.M.; SPRENT, J.I. 1984. Distribution of nitrate reductase activity in six legumes: the importance of the stem. *The New Phytologist* 98:301-310.
3. BEDMAR, E.J.; OLIVARES, J. 1980. Effect of chemical inhibitors of photorespiration on nitrogenase activity in nodulated alfalfa plants. *Planta* 150: 299-302.
4. BEDMAR, E.J.; EDIÉ, S.D.; PHILLIPS, D.A. 1983. Host cultivar effect on hydrogen evolution by *Rhizobium leguminosarum*. *Plant Physiology* 72: 1011-1015.
5. BEEVERS, L.; HAGEMAN, R.H. 1983. Uptake and reduction of nitrate: bacteria and higher plants. In *Encyclopedia of Plant Physiology* Ed by A. Pirson and M.H. Zimmermann. Berlin, Springer-Verlag. p. 351-375.
6. BRUNETTI, N.; HAGEMAN, R.H. 1976. Comparison of in vivo assays of nitrate reductase in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings. *Plant Physiology* 58: 583-587.
7. BURNS, R.C.; HARDY, R.W.F. 1975. Nitrogen fixation in bacteria and higher plants. New York, Springer-Verlag. p. 121-132.
8. DIXON, R.O.D. 1968. Hydrogenase in pea root nodule bacteroids. *Archives of Microbiology* 62:272-283.
9. DIXON, R.O.D. 1972. Hydrogenase in legume root nodule bacteroids: occurrence and properties. *Archives of Microbiology* 85:193-201.
10. EMERICH, D.W.; RUIZ-ARGÜESTO, I.; CHING, M.T.; EVANS, H.J. 1979. Hydrogen-dependent nitrogenase activity and ATP formation in *Rhizobium japonicum* bacteroids. *Journal of Bacteriology* 137: 153-160.
11. EVANS, H.J.; HARKER, A.R.; PAPAN, H.; RUSSELL, S.A.; HANUS, J.F.; ZUBER, M. 1987. Physiology, biochemistry and genetics of the uptake hydrogenase in rhizobia. *Annual Review of Microbiology* 41:355-361.
12. HAGEMAN, R.H.; HUCKLESBY, D.D. 1971. Nitrate reductase from higher plants. *Methods in Enzymology*. Ed. by A. San Pietro. New York Academic Press. p. 491-503.
13. HUNTER, W.J. 1983. Soybean root and nodule nitrate reductase. *Physiologia Plantarum* 59:471-475.
14. JARVIS, B.D.W.; PANKHURST, C.E.; PATEL, J.J. 1982. *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* 32:378-380.
15. LIGERO, F.; LLUCH, C.; OLIVARES, J.; BEDMAR, E.J. 1987. Nitrate reductase activity of pea inoculated with hydrogenase positive and hydrogenase negative strains of *Rhizobium leguminosarum*. *Physiologia Plantarum* 69:313-316.
16. LOPEZ, M.; CARBONERO, V.; CABRERA, E.; RUIZ-ARGÜESTO, T. 1981. Effects of host on the expression of H₂-up-take hydrogenase of *Rhizobium* in legume root nodules. *Plant Science Letters* 29:191-199.
17. MAIER, R.J.; CAMPBELL, N.E.R.; HANUS, F.J.; SIMPSON, F.B.; RUSSELL, S.A.; EVANS, H.J. 1978. Expression of hydrogenase activity in free-living *Rhizobium japonicum*. *Proceedings of the National Academy of Science (USA)* 75:3258-3262.
18. MELLOR, G.E.; SHEARD, R.W. 1971. Comparison of the nitrate reductase in orchardgrass and birdsfoot trefoil. *Canadian Journal of Plant Science* 51:399-404.
19. PANKHURST, C.E.; JONES, W.T. 1979. Effectiveness of *Lotus* root nodules II. Relationship between root nodule effectiveness and in vitro sensitivity of fast-growing *Lotus* rhizobia to flavolans. *Journal of Experimental Botany* 30:1099-1107.
20. PANKHURST, C.E.; JONES, W.T.; CRAIG, A.S. 1982. Bactericidal effect of *Lotus pedunculatus* root flavolan on fast-growing *Lotus* rhizobia. *Journal of General Microbiology* 128:1567-1576.
21. RADIN, J.W. 1978. A physiological basis for the division of nitrate assimilation between roots and leaves. *Plant Science Letters* 13:21-25.
22. RIGAUD, J.; PUPPO, A. 1975. Indole-3-acetic acid catabolism by soybean bacteroids. *General Journal of Microbiology* 88:223-228.
23. SICARDI DE MALLORCA, M.; LABANDERA, C. 1979. Control de calidad de los inoculantes comerciales para leguminosas en Uruguay (1963-1975). Montevideo, (Uru.) Ministerio de Agricultura y Pesca. p. 1-17. (Boletín Técnico no. 1).
24. STREETER, J.G. 1982. Synthesis and accumulation of nitrite in soybean nodules supplied with nitrate. *Plant Physiology* 69:1429-1434.
25. TIMPO, E.E.; NEYRA, C.A. 1983. Expression of nitrate and nitrite reductase under various forms of nitrogen nutrition in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology* 72:71-75.
26. VANCE, C.P.; HEICHEL, G. 1981. Nitrate assimilation during vegetative regrowth of alfalfa. *Plant Physiology* 68:1052-1056.
27. WALLACE, W. 1986. Distribution of nitrate assimilation between the root and shoot of legumes and a comparison with wheat. *Plant Physiology* 66:630-636.

Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* in Soil¹

A M Alippi*

ABSTRACT

The survival of a rifampin-resistant mutant of *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*, the cause of bacterial blight of cotton, was determined in sterile and non-sterile black earth soil. In non-sterile soil the pathogen was not detectable after 50 days and in sterile soil after 80 days at 20°C (± 2°C). These results confirm that this pathogen has limited capacity for survival in soil free from cotton plant material.

INTRODUCTION

Bacterial blight of cotton caused by *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (6) is considered one of the most serious diseases of cotton in many production areas throughout the world (11). Although much is known about the prolonged survival of the pathogen in plant debris (1, 3, 14, 15), occurrence as a resident on leaf surfaces (13) and the importance of infected seed in the disease cycle (2, 4, 8, 16), very little is known about the survival in the soil of *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*, or of other pathogens of *Xanthomonas campestris*, free of plant material.

The purpose of this investigation was to examine the survival in a black earth clay soil of a rifampin-resistant mutant of the bacterial blight pathogen.

Sterile and non-sterile soils were compared in order to evaluate whether the pathogen is capable of surviving with and without the competition of antagonistic microflora. Investigations were undertaken as to whether such populations of the pathogen persisted over winter, thus serving as an inoculum to reestablish new infections in the following season.

¹ Received for publication 8 October 1988.

This work was carried out at the Department of Microbiology, University of Queensland, Australia during the term of a CONICET grant. The author is grateful to Dr. A.C. Hayward for his suggestions during this research and help in the preparation of the manuscript.

* Research scientist CIC. Cátedra de Fitopatología. Facultad de Agronomía Universidad Nacional de La Plata. 1900 La Plata ARGENTINA.

COMPENDIO

En este trabajo se estudió la supervivencia en suelos estériles y no estériles de *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*, agente causal del tizón bacteriano del algodón. Se empleó un mutante bacteriano resistente a rifampicina. El patógeno tuvo una supervivencia máxima de 50 días en suelos esterilizados y de 80 días en suelos sin esterilizar, ambos mantenidos a 20°C (± 2°C). Estos resultados confirman que *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* tiene una capacidad limitada para vivir en suelos carentes de restos del cultivo de algodón.

MATERIALS AND METHODS

A mutant designated 11m-ma of *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (UAM 2702) resistant to 100 µg ml⁻¹ of rifampin (Rifampicin[®], an antibiotic which specifically inhibits DNA-dependent RNA polymerase of bacterial and chloroplast origin) was isolated by the following procedure. A suspension in sterile distilled water containing 10¹⁰ cfu ml⁻¹ was prepared from a 36 h culture, and 0.1 ml volumes were spread with a glass spreader over the surface of dried plates of sucrose-peptone agar (SPA) (7) containing 0.1 µg ml⁻¹ rifampin. Colonies developing on this medium were streaked on progressively higher concentrations (0.5; 1.0; 5.0; 10.0; 15.0; 20.0; 25.0; 50.0 and 75.0 µg ml⁻¹) until a strain resistant to 100 µg ml⁻¹ was obtained (5). The 11m-ma was used as a genetically marked strain and its pathogenicity was determined by spray inoculation of cotton plants. The differential cultivars required to determine races (9) were also inoculated.

Samples of a black earth clay soil—Vertisol (17)—were collected at random in a field used for cotton cultivation at Brookstead, Southeastern Queensland. Samples were bulked and broken up and subsamples removed for the determination of field capacity and air dry moisture content.

Three hundred grams of air-dried soil were placed in each of six polythene bags (30 x 42 cm x 0.1 mm). Three of the bags were sterilized in an autoclave at 108°C for 1 h on each of three successive days.

Suspensions of rrm-ma were prepared from 48 h SPA medium containing rifampin ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) in sterile distilled water to a concentration of $10^{1.0}$ cfu ml^{-1}

Each sample was inoculated by spraying the soil surface with the bacterial suspension, and the moisture content of the soil was adjusted to 70% of the water holding capacity. The plastic bags were closed by folding three times and tying with a rubber band, in order to minimize moisture loss. The bags were held in a box in the dark at a temperature of $20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. The moisture content of the soil samples was measured at intervals and adjusted to the original level.

At 10-day intervals two 1 g samples of soil were withdrawn from each bag. One of the 1 g samples was dried overnight at 105°C in order to determine the oven-dried weight, and on this basis the moisture content of the soil was adjusted by addition of sterile distilled water. The second 1 g sample was added to 9 ml of sterile distilled water, shaken vigorously for 30 min and diluted in a tenfold series. Triplicate 0.1 ml volumes of the three highest dilutions were spread over the surface of SPA medium containing rifampin ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) and cycloheximide (Actidione®) ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$), the latter to suppress fungal growth. The plates were incubated for 72 h at 28°C and yellow mucoid colonies of *Xanthomonas* were then counted using a Quebec colony counter.

RESULTS AND DISCUSSION

The mutant, rrm-ma, was found to be as virulent to cotton as the parental wild type and both conformed in character to race 18 of the blight pathogen as described by Hunter *et al.* (9) and Hussain and Brinkerhoff (10)

The results show that *X. campestris* pv. *malvacearum* survived for a longer period in sterile as compared with non-sterile soil (Fig. 1). In non-sterile soil the bacterium was no longer detectable after 50 days, whereas in sterile soil the bacterium was no longer detectable after 80 days.

LITERATURE CITED

1. ARK, P.A. 1958. Longevity of *Xanthomonas malvacearum* in dried cotton plants. *Plant Disease* 42:1293.
2. ARNOLD, M.H.; ARNOLD, K.M. 1961. Bacterial blight of cotton, trashborne infection. *Empire Cotton Growing Review* 38:258-270.

The bacterial blight pathogen can overwinter in infected plant debris on the soil surface; however, cotton debris buried in moist soil lost infectivity in 40-107 days depending on the extent of microbial decomposition of the debris, and the pathogen survived for eight days when applied in water suspensions in both moist and air dried soil at $21-33^\circ\text{C}$ (3). Similarly, Arnold and Arnold (2) found that infected cotton trash lost infectivity when buried, sooner than trash lying on the ground. They concluded that although the pathogen may survive in trash until sowing time, it is unlikely to cause infection of the new crop if the trash is effectively buried during cultivation.

These observations suggest that although the bacterial blight pathogen can survive for periods making dissemination by wind-borne dust possible or movement of surface water, survival in plant debris is likely to be of much greater significance in the epidemiology of the disease, as *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* appear to be a poor competitor with other soil organisms under natural situations.

There may be several reasons for the greater survival of free cells of the bacterial blight pathogen in sterile soil compared with non-sterile soil, including the absence from sterile soil of predation by protozoa, bacteriophage lysis, antibiotic production by antagonistic microflora, or of nutrient competition effects (12)

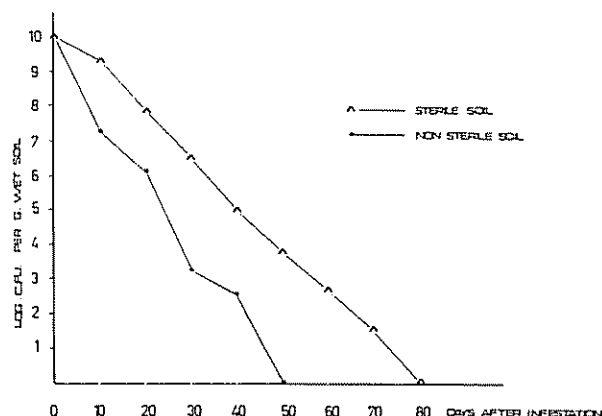


Fig 1 Populations of *X. c.* pv. *malvacearum* (rrm-ma) on sterile and non-sterile soil. Values are average of three replications.

3. BRINKERHOFF, L.A.; KINK, G.B. 1964. Survival and infectivity of *Xanthomonas malvacearum* in cotton plant debris and soil. *Phytopathology* 54:1 198-1 201.
4. BRINKERHOFF, L.A.; HUNTER, R.E. 1963. Internally infected seed as a source of inoculum for the primary cycle of bacterial blight of cotton. *Phytopathology* 53:1 397-1 401.
5. CAFATI, C.R.; SAETTLER, A.W. 1980. Effect of host on multiplication and distribution of bean common blight bacteria. *Phytopathology* 70:675-679.
6. DYE, D.W.; BRADBURY, J.F.; GOTO, M.; HAYWARD, A.C.; LELLIOT, R.A.; SCHROTH, M.N. 1980. International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. *Review of Plant Pathology* 59:153-168.
7. HAYWARD, A.C. 1960. A method for characterizing *Pseudomonas solanacearum*. *Nature (London)* 186:405-406.
8. HUNTER, R.E.; BRINKERHOFF, L.A. 1964. Longevity of *Xanthomonas malvacearum* on and in cotton seed. *Phytopathology* 54:617.
9. HUNTER, R.E.; BRINKERHOFF, L.A.; BIRD, L.S. 1968. The development of a set of upland cotton lines for differentiating races of *Xanthomonas malvacearum*. *Phytopathology* 58:830-832.
10. HUSSAIN, T.; BRINKERHOFF, L.A. 1978. Race 18 of the cotton bacterial blight pathogen, *Xanthomonas malvacearum* identified in Pakistan in 1977. *Plant Disease* 62:1 085-1 087.
11. INNES, N.L. 1983. Bacterial blight of cotton. *Biological Review* 58:157-176.
12. MARSHALL, K.C. 1975. Clay mineralogy in relation to survival of soil bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 13:357-373.
13. MOFFEIT, M.L.; WOOD, B.A. 1985. Resident population of *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* on cotton leaves: a source of inoculum for bacterial blight. *Journal of Applied Bacteriology* 58:607-612.
14. SCHNATHORST, W.C. 1964. Longevity of *Xanthomonas malvacearum* in dried cotton plants and its significance in dissemination of the pathogen on seed. *Phytopathology* 54:1 009-1 011.
15. SCHNATHORST, W.C. 1969. Extension of the period of survival of *Xanthomonas malvacearum* in dried cotton tissue. *Phytopathology* 59:707.
16. SCHNATHORST, W.C.; HALISKY, P.; MARTIN, R.D. 1960. History, distribution and disease cycle of *Xanthomonas malvacearum* in California. *Plant Disease* 44:603-608.
17. SOIL SURVEY STAFF. 1975. Soil taxonomy. Washington, D.C., USDA Handbook 436.

Flujo Preferencial de Agua y Solutos en un Suelo Tropical sin Disturbar¹

E. Solórzano*, R. Radulovich*

ABSTRACT

Work was conducted with a soil classified as Oxic Dystropept, highly aggregated and practically undisturbed, under secondary forest and long-abandoned pasture, in the humid tropical region of Sarapiquí, Costa Rica. The behavior of water and solute flux was studied using the dye Rodhamine B in the field and in undisturbed soil cores in the laboratory, and solute (CaCl₂) breakthrough curves in the laboratory. Pathways of preferential flux were determined for water and solutes, through macropores that generate a biphasic behavior, with two types of flux: one mobile (inter-aggregates) and one practically immobile (intra-aggregates). The effects of these factors in relation to water are that excesses drain rapidly due to structure, while large amounts of moisture are retained in the soil matrix due to clayey texture. The results of the solute breakthrough curves indicate that, due to the high resistance to leaching exhibited by the soil, the biphasic behavior represents an efficient mechanism of nutrient retention against the high amounts of percolating waters. However, the soil matrix also presents high resistance to the incorporation of solutes, which tend to travel preferentially, via macropores, with little opportunity to become incorporated in the intra-aggregate space. It is suggested that the relevance of these processes in perennial agricultural systems should be studied, because of their similarity with the natural systems described here, with possible negative effects on fertilizer application efficiency.

INTRODUCCION

Recientes modelos de caracterización del flujo de agua en el suelo proponen un comportamiento bifásico, presentando una solución móvil en la fase inter-agregados, formada por los macroporos, mientras que en la matriz del suelo, o fase intra-agregados, se encuentra una solución básicamente inmóvil contenida en los microporos (5, 11, 16, 17).

Así, en suelos altamente estructurados, el flujo de agua podría ocurrir principalmente por caminos preferenciales, dentro de la fase inter-agregados, producidos éstos por la alta agregación y la acción de micro-

COMPENDIO

El presente trabajo se realizó con un suelo clasificado como Oxic Dystropept, altamente agregado y poco disturbado, bajo bosque secundario y pastizal abandonado por largo tiempo en la región tropical húmeda de Sarapiquí, Costa Rica. Se estudió el comportamiento del flujo de agua y de solutos mediante el uso del tinte Rodhamina B en el campo y utilizando muestras indisturbadas en laboratorio, y de curvas de traspaso de iones (CaCl₂) en laboratorio. Se determinó la presencia de caminos de flujo preferencial del agua y solutos en el suelo, vía macroporos, generando un comportamiento bifásico, con dos tipos de flujo: uno móvil (inter-agregados) y otro prácticamente estático (intra-agregados). La consecuencia de estos factores, con relación al agua, es que los excesos drenan rápidamente debido a la estructura, mientras que la matriz retiene alta humedad debido a la textura arcillosa. Los resultados de las curvas de traspaso de iones indican que, debido a la alta resistencia que presenta el suelo a la lixiviación, el comportamiento bifásico representa un eficiente mecanismo de retención de nutrimentos contra el lavado que produciría la alta precipitación de la zona. Sin embargo, la matriz del suelo también ofrece alta resistencia a la incorporación de solutos, los cuales tienden a viajar preferencialmente vía macroporos, con poca oportunidad de incorporación a los espacios intra-agregados. Se sugiere estudiar la relevancia de estos procesos en sistemas agrícolas de cultivos perennes ya que podrían presentar gran similitud con los sistemas naturales aquí estudiados, lo que podría incidir negativamente en aspectos de eficiencia en la aplicación de fertilizantes.

organismos y raíces (2, 3, 15). La importancia de los flujos preferenciales del agua se relaciona con la dinámica de entrada y salida de nutrimentos y otros solutos a la matriz, ya que la solución percolante, vía macroporos, interacciona débilmente con ésta. Sin embargo, estos procesos han sido poco estudiados en suelos tropicales y sus efectos en la dinámica nutricional del suelo son poco entendidos, e incluso controversiales (10, 12, 13).

Este estudio, diseñado para elucidar algunos de los procesos de intercambio de iones entre matriz del suelo y solución percolante, se basó en análisis de patrones de conducción de agua a través del perfil y en la generación en laboratorio de curvas de traspaso de iones (8) utilizando muestras sin disturbar. Se logró una caracterización física del patrón de drenaje interno, relacionando a la vez su influencia en la resisten-

¹ Recibido para publicación el 20 de junio 1988.

* Profesores, Escuela de Ingeniería Agrícola, Universidad de Costa Rica Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, San José, Costa Rica.

cia o facilidad ofrecida por el suelo al intercambio de solutos

MATERIALES Y METODOS

Descripción del suelo

El área de estudio está localizada en Puerto Viejo de Sarapiquí, Costa Rica (10:26 N, 83:59 O), en el Anexo La Guaría de la Estación Biológica La Selva. Tiene una elevación de alrededor de 50 msnm, con una precipitación promedio anual de 4000 mm, sin período seco definido y temperatura media de 24°C (Estación Meteorológica La Selva, 1957-83). Las muestras de suelo provienen de un bosque secundario y de un pastizal poco utilizado y abandonado por varios años, por lo que presentan poca disturbación (9, 10).

El suelo en estudio es de origen volcánico, clasificado como **Oxic Dystropept** (F. Sancho y R. Mata, 1987, clasificación sin publicar). Se caracteriza por la ausencia de capas limitantes al drenaje hasta una profundidad mínima de 2 m, alto contenido de arcilla, alto grado de agregación, densidad aparente menor de 1.0 g cm⁻³ hasta 1 m de profundidad, marcada dispersión tras agitación por sonicación, alto grado de compactibilidad, baja resistencia a la penetración y altas tasas de infiltración inicial que superan los 100 cm h⁻¹ (9, 10, 14).

Tanto los experimentos de flujo como de traspaso de iones descritos seguidamente, fueron realizados durante la época lluviosa, con el suelo alrededor de capacidad de campo.

Áreas conducentes durante el flujo saturado

Las secciones conducentes de agua libre en el suelo se estudiaron a nivel de campo y de laboratorio, usando el tinte Rodamina B disuelto en agua, con una concentración aproximada de 1:10 v/v. (1).

En los análisis de laboratorio se utilizaron 20 muestras de suelo sin disturbar, contenidas en cilindros de acero de 20 cm de largo por 10.75 cm de diámetro interno, con grosor de paredes de 2 mm. La saturación se realizó con agua destilada; seguidamente, se adicionó a cada muestra un litro de la solución de tinte, manteniendo siempre una columna de líquido de 1 cm sobre la superficie de la muestra.

En el campo, la solución del tinte se aplicó sobre 10 lotes de 50 cm por lado, con una regadera, para simular condiciones de lluvia intensa, no permitiendo el desarrollo de carga sobre el suelo en ningún momento.

Las secciones conducentes marcadas por el tinte, en ambos casos, se obtuvieron mediante disección de las muestras de suelo, colocando láminas plásticas transparentes sobre ellas y dibujando las siluetas o secciones marcadas por el tinte. En el caso de los cilindros, la disección mostrada corresponde a 18 cm de profundidad.

Curvas de traspaso de iones

Para generar las curvas de traspaso de iones (7, 8), se utilizaron 15 muestras de suelo sin disturbar, contenidas en los cilindros de acero descritos y recolectadas al azar en las áreas de estudio. Para un proceso de homogenización de la solución de la matriz, se saturaron las muestras en el laboratorio con CaCl₂ 0.5 mN como solución de saturación, manteniendo una columna de 1.0 cm de solución sobre la superficie de la muestra. Esta concentración, 0.5 mN, asemeja a la encontrada naturalmente en este suelo. La conductividad eléctrica (CE) de las soluciones empleadas se utilizó como parámetro representativo de sus concentraciones.

Una vez saturada la muestra, esto es, cuando la conductividad eléctrica de la solución efluente (CE_{ef}) fue igual a la de la solución de saturación (CE_{sat}), se interrumpió la aplicación de CaCl₂ 0.5 mN, agregándose una solución de conductividad eléctrica 10 veces superior (CaCl₂ 5 mN) al momento que la columna de CaCl₂ 0.5 mN alcanzó la superficie de la muestra. Se estableció de nuevo y sin interrupción, la carga de 1 cm sobre la superficie, esta vez con CaCl₂ 5 mN que se convirtió en la solución de traspaso (CE_{tras}). Así, primero se saturó la muestra con una solución diluida (0.5 mN) la cual fue luego reemplazada por una solución diez veces más concentrada (5 mN).

Durante el proceso de saturación con la solución 0.5 mN se muestreó la solución efluente cada 50 ml midiendo su CE (CE_{ef}). Luego del cambio de solución de 0.5 a 5 mN, la conductividad eléctrica de la solución efluente se midió cada 15 ml para los primeros 150 ml, aumentando luego el volumen de las muestras hasta un total recolectado de alrededor de 5000 ml.

Similarmente, se generaron curvas de traspaso de iones en forma inversa, provocando una acción de lavado de los iones, en muestras que se habían sometido a la incorporación de solutos a la matriz, según el procedimiento anterior. Para ello se saturó primero con la solución de CaCl₂ 5 mN y el lavado se realizó con CaCl₂ 0.5 mN como solución de traspaso, utilizando un procedimiento análogo al descrito anteriormente en la generación de las curvas.

La representación gráfica de las curvas muestra en el eje de las ordenadas el cociente de las concentraciones efluentes y de traspaso, mientras que en las abscisas se ubica la fracción del volumen de poros drenada. La fracción de volumen de poros drenada (VP_i) está dada por el cociente del volumen efluente colectado entre el "volumen de poros" unitario de la muestra, definido por Nielsen y Biggar (7) como el equivalente al contenido volumétrico de agua a saturación

Para el cálculo del cociente de concentraciones (C/C_0 , donde C = conductividad eléctrica de la solución efluente, y C_0 = conductividad eléctrica de la solución de traspaso) se empleó la relación siguiente:

$$C/C_0 = (CE_{ef} - CE_{sat}) / (CE_{tras} - CE_{sat}) \quad (1)$$

RESULTADOS Y DISCUSION

El suelo estudiado, con una textura arcillosa, es por su estructura un suelo bien drenado y de buenas condiciones de trabajabilidad, aún bajo condiciones de alta humedad. Las muestras de los cilindros presentaron alta conductividad hidráulica saturada, con un promedio de 80 cm h^{-1} y una amplia variación, desde los 20 hasta los 350 cm h^{-1} , incluso, para muestras recolectadas en el campo separadas sólo 50 cm entre sí

La existencia de conductos de flujo preferencial en el suelo, para la condición de flujo saturado, se evidenció en los patrones de conducción marcados por el tinte Rodhamina B (Fig. 1), donde se observó cla-



Fig. 1. Secciones de flujo preferencial, marcadas por el tinte Rodhamina B, en muestras sin disturbar contenidas en los cilindros.

ramente la presencia de canales y grietas en el suelo que actúan como conductores principales del agua hacia niveles inferiores del perfil. Aún de mayor importancia fue el encontrar un patrón semejante en flujo preferencial en el campo, con aplicaciones simulando lluvia que no superaron la capacidad de infiltración del suelo (Fig. 2), lo cual evidenció que el agua fluye por macroporos (o espacios inter-agregados) sin necesidad de una carga sobre el suelo. Estos caminos de flujo preferencial le confieren al suelo características deseables en cuanto a drenaje, pues, en condiciones de alta pluviosidad, evacúan rápidamente el agua y restauran el equilibrio líquido-gas necesario para el buen desarrollo de la vegetación

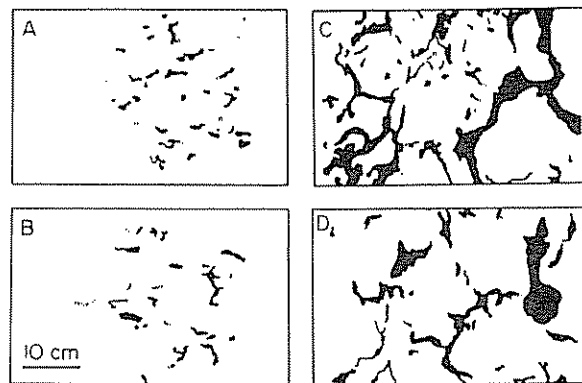


Fig. 2. Patrones de flujo preferencial en el campo obtenidos por aplicación de tinte. Areas de pastizal (A, B) y de bosque (C, D), a dos profundidades: A y C = 10 cm, B y D = 20 cm. La solución con tinte fue aplicada simulando precipitación, en ningún momento excediendo la capacidad de infiltración del suelo

Los patrones de conducción marcados por el tinte, presentaron continuidad a diferentes profundidades e indicaron la existencia de cauces principalmente verticales, explicando las altas tasas de infiltración encontradas y su variabilidad (Fig. 2). Así mismo, las grietas observadas, en algunos casos de tamaño considerable, fueron encontradas aún en temporadas de alta precipitación, donde su presencia obedeció a condiciones de estructura y no de humedad. También, es notable que en su gran mayoría los conductos se encontraban llenos de material esponjoso, producto posiblemente de descomposición de raíces. Así, se deduce que no toda el área con tinte participa en conducción sino que éstas comprenden una matriz de material poroso altamente conductente.

La Fig. 3 presenta curvas de traspaso de iones en dos modalidades, ascendente y descendente, para el suelo en estudio. Se encontró que la solución percolante traspasó rápidamente la muestra a bajos volúmenes de poros percolados (0.1 a 0.2 volúmenes de poros), como resultado de la presencia de caminos de flujo preferencial, con escasa interacción con la solu-

ción del suelo en los espacios intra-agregados. También, se observó la resistencia del suelo a ser completamente lavado por la solución percolante, lo cual se evidenció por el comportamiento asintótico de las curvas hacia el valor de completa sustitución $C/C_0=1$ y $C/C_0=0$, ascendente o descendente, respectivamente, aún después de 4 y 5 volúmenes de poros percolados (Fig. 3).

La caracterización del sistema de conducción mediante curvas de traspaso de iones ha generado modelos matemáticos que explican el comportamiento del agua en su recorrido por el perfil de suelo (4, 8, 11, 17). De la comparación de las formas de las curvas obtenidas con las curvas típicas de los modelos de flujo (ver recuadro de la Fig. 3), se observó su correspondencia con el patrón bifásico "C" especialmente en la forma asintótica hacia el valor de 1.0 del cociente de concentración, después de varios volúmenes de poros percolados. También, se manifestó la presencia de alta macroporosidad en el rápido cambio inicial de los valores del cociente de concentración, los cuales alcanzaron, tanto en ascenso como en descenso, valores de $C/C_0 = 0.5$ en menos de un volumen de poros.

El paso de agua por estos canales preferenciales durante condiciones de saturación promueve que ésta no

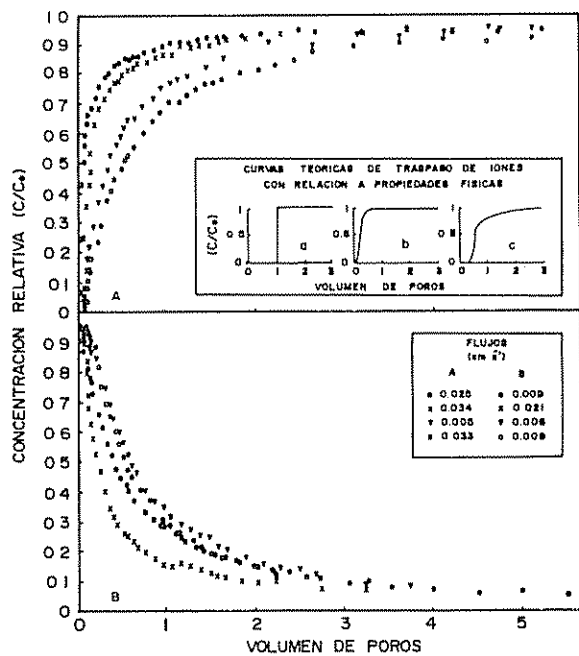


Fig 3 Curvas de traspaso de iones obtenidas para muestras de suelo sin disturbar en cilindros, en forma ascendente (A) y descendente (B) en relación a incorporación o lavado de solutos, respectivamente. En el recuadro se muestran patrones típicos: a-flujo pistón, b-flujo por macroporos, c-flujo bifásico. (Adaptados de McVoy, (6))

se mezcle con la solución almacenada en la matriz, lo que define la existencia del sistema bifásico característico de suelos muy estructurados. Es importante notar que esto sucedió en el campo, sin necesidad de carga simulando precipitación (Fig. 2).

Las características tan apreciadas para el drenaje parecieron desfavorables para la adición de fertilizantes u otros productos que requieran su disolución en agua mediante la lluvia, pues, bajo condiciones de alta precipitación y en suelos que exhiben flujo preferencial podría producirse una pérdida considerable de éstos, por percolación hacia niveles profundos, debido a la poca interacción con la matriz, disminuyendo la asimilación para uso de los cultivos. Esto indicaría la necesidad de efectuar aplicaciones de fertilizantes escalonados en este tipo de suelos, bajo condiciones de alta precipitación, en forma similar a las prácticas recomendadas para suelos arenosos.

El mantenimiento del contenido nutricional en los sistemas naturales es sin embargo, favorecida por estos procesos ya que el contenido de solutos presentes en la matriz se verá poco alterado por el agua percolante por flujo preferencial. Esto tendería a disminuir la lixiviación y podría representar un mecanismo poco explorado de mantención de homeostasis en sistemas naturales.

El flujo preferencial, así como el comportamiento bifásico observado en los sistemas naturales estudiados, hacen pensar que los sistemas agrícolas de cultivos perennes podrían presentar características similares; sin embargo, esta comprobación, como el estudio detallado del flujo en sistemas agrícolas de mayor laboreo, sugiere la necesidad de mayor investigación al respecto relacionada con el movimiento del fertilizante a través del perfil del suelo y sus pérdidas por percolación.

CONCLUSIONES

Los sistemas naturales estudiados, con suelos altamente agregados y sometidos a alta precipitación, presentan un comportamiento bifásico del flujo de agua y solutos a través del perfil. Este comportamiento confiere a los suelos características de buen drenaje y de alta retención de humedad, a la vez que fomenta la mantención de su contenido nutricional, al percolar el agua por caminos de flujo preferencial. Esto último, aparentemente, representa una desventaja en relación a la incorporación de solutos en la matriz, afectando negativamente la eficiencia de la aplicación de fertilizantes.

Se sugiere el estudio de los efectos de estos mecanismos en las relaciones nutricionales en sistemas agri-

colas de cultivos perennes. dada su similitud con los sistemas naturales aquí descritos, así como de otros sistemas agrícolas con mayor grado de disturbación del suelo por laboreo

LITERATURA CITADA

1. ANDERSON, J.L.; BOUMA, J. 1973. Relationships between hydraulic conductivity and morphometric data of an argillic horizon. Soil Science Society of American Proceedings (EE UU) 37:408-413
2. AUBERTIN, G.M. 1971. Nature and extent of macropores in forest soils and their influence on subsurface water movement. New York, USDA Forest Service Research 33 p. Paper no. 192.
3. BEASLEY, R.S. 1976. Contribution of subsurface flow from the upper slopes of forested watersheds to channel flow. Soil Science Society of American Journal (EE UU) 40:219-222
4. BEVEN, K.; GERMANN, P.F. 1982. Macropores and water flow in soil. Water Resources Research (EE UU) 18:1311-1325
5. HILLEL, D. 1980. Fundamentals of soil physics. New York, Academic Press. 413 p.
6. McVOY, C. W. 1985. Water and solute movement in an aggregated tropical soil: use of iodide and dyes for a morphological characterization. M.Sc. Thesis. Florida, University of Florida. 101 p.
7. NIELSEN, D.R.; BIGGAR, J.W. 1961. Miscible displacement in soils: I. Experimental information. Soil Science Society of America Proceedings (EE UU) 25:1-5
8. NIELSEN, D.R.; BIGGAR, J.W. 1962. Miscible displacement in soils: III. Theoretical considerations. Soil Science Society of America Proceedings (EE UU) 26:216-221.
9. RADULOVICH, R.; SOLLINS, P. 1985. Compactación de un suelo aluvial por tráfico de personas. Agronomía Costarricense (C.R.) 9:143-148.
10. RADULOVICH, R.; SOLLINS, P. 1987. Improved performance of zero-tension lysimeters. Soil Science Society of America Journal (EE UU) 51:1386-1388
11. RAO, P.S.C.; GREEN, R.E.; BALASUBRAMANIAN, V.; KANEHIRO, Y. 1974. Field study of solute movement in a highly aggregated oxisol with intermittent flooding: II. Picloram. Journal of Environmental Quality (EE UU) 3:197-202
12. RUSSELL, A.E.; EWEL, J.J. 1985. Leaching from a tropical Andept during big storms: a comparison of three methods. Soil Science (EE UU) 139:181-189
13. SEYFRIED, M.S.; RAO, P.S.C. 1987. Solute transport in undisturbed columns of an aggregated tropical soil: preferential flow effects. Soil Science Society of America Journal (EE UU) 51:1434-1444.
14. SOLLINS, P.; ROBERTSON, G.P.; UEHARA, G. 1988. Nutrient mobility in variable- and permanent-charge soils. Biogeochemistry (EE UU). (En prensa).
15. TIPPKOTTER, R. 1983. Morphology, spatial arrangement and origin of macropores in some hapludalls, West Germany. Geoderma (Nether) 29:355-371
16. VAN GENUCHTEN, M.T.; DALTON, F.N. 1986. Models for simulating salt movement in aggregated field soils. Geoderma (Nether) 38:165-183.
17. VAN GENUCHTEN, M.T.; WIERENGA, P.J. 1976. Mass transfer studies in sorbing porous media. I. Analytical solutions. Soil Science Society of America Journal (EE UU) 40:473-480.

Vigor Híbrido y Capacidad Combinatoria en Trigo (*T. aestivum* L.) para Rendimiento y sus Componentes, Macollaje, Altura y Ciclo a Espigazón¹

M.R. Simón*

ABSTRACT

Five wheat (*T. aestivum* L.) cultivars were crossed in a diallel system. Heterosis, heterobeltiosis and combining ability in eight characters were evaluated for grain yield, number of spikes per plant, number of spikelets per spike, kernel weight, tillering, plant height and heading date. Heterosis and heterobeltiosis for grain yield ranked from -38.23% to 98.90% and from -43.86% to 90.48%, respectively. There was neither increase nor reduction in the height of the hybrids as compared with their parents' average. The hybrids' heading dates were earlier than their parents' average. Griffing's combining ability analysis, method 2, model 1, indicated preponderance of general combining ability (additive gene action) in number of spikelets per spike, number of grains per spike, kernel weight, plant height and heading date and preponderance of specific combining ability (non-additive gene action) in grain yield, number of spikes per plant and tillering. The data show that, in some hybrid combinations, genetic barriers that preclude use in hybrid wheat do not exist.

INTRODUCCION

La producción de trigos híbridos exige el logro de un incremento considerable de rendimiento sobre el de las mejores variedades, que debe compensar el alto costo de la semilla obtenida. La manifestación del vigor híbrido en el rendimiento ha sido diferente en los diversos trabajos realizados al respecto. Bitzer y Fu (2) señalaron que los híbridos no fueron significativamente superiores en producción al mejor progenitor. Müller *et al.* (9) determinaron que algunos de los cruzamientos obtenidos dieron valores superiores al progenitor de mayor rendimiento. Patterson y Bitzer (11), y Wilson (15) señalaron que los híbridos más productivos serán aquellos que se obtengan entre progenitores, con una amplia diversidad genética.

¹ Recibido para publicación el 26 de abril de 1988.
Trabajo realizado en la Cátedra de Cerealicultura de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de La Plata 60 y 118 La Plata. Profesor Titular: Héctor O. Arriaga.

La autora agradece al Profesor Titular de Genética y Mejoramiento Vegetal, Ing. Agr. Miguel Arturi, la lectura crítica de este trabajo.

* Jefe de Trabajos Prácticos de dicha Cátedra.

COMPENDIO

Se cruzaron cinco variedades de trigo (*T. aestivum* L.) en un sistema diallelo. Se evaluó heterosis, heterobeltiosis y capacidad combinatoria en ocho caracteres, a saber: rendimiento, número de espigas por planta, número de espiguillas por espiga, número de granos por espiga, peso de mil granos, macollaje, altura y ciclo a espigazón. La heterosis y heterobeltiosis para rendimiento variaron de -38.23% a 98.90%, y de -43.86% a 90.48%, respectivamente. No hubo incrementos o reducciones en la altura de los híbridos en relación al promedio de sus progenitores. Las fechas de espigazón de los híbridos fueron más tempranas que el promedio de sus progenitores. El análisis de capacidad combinatoria de Griffing, método 2, modelo 1, indicó la preponderancia de la capacidad combinatoria general (acción génica aditiva) en número de espiguillas por espiga, número de granos por espiga, peso de mil granos, altura y ciclo a espigazón; y preponderancia de la capacidad combinatoria específica (acción génica no aditiva) en rendimiento, número de espigas por planta y macollaje. Los datos muestran que algunas de las combinaciones híbridas no presentan barreras genéticas que impidan su utilización en trigos híbridos.

También, se han detectado diferencias en el vigor híbrido de los diferentes componentes del rendimiento (4, 9, 10, 11).

Resulta de interés, además, determinar el comportamiento de los híbridos con respecto a altura de planta y a ciclo a espigazón. En estos caracteres, Bitzer y Fu (2) encontraron que los híbridos fueron ligeramente más bajos que el progenitor más alto y, en general, de ciclo más largo que el progenitor más precoz. Brown *et al.* (3) hallaron que la mayor parte de los híbridos superaron en altura al promedio de los progenitores y algunos de ellos fueron superiores al progenitor más alto. Nettevic (10) determinó que los híbridos fueron intermedios con respecto a sus progenitores, o iguales al progenitor más precoz. Anwar y Chowdhry (1) encontraron que los cruzamientos obtenidos fueron superiores en altura al promedio de los progenitores y que el ciclo de los mismos se acercó a dicho promedio.

Se han realizado varios trabajos para determinar la capacidad combinatoria general y específica en trigo. La capacidad combinatoria general está asociada con

acción génica aditiva, en tanto que la capacidad combinatoria específica está determinada por acción génica no aditiva (5, 7). En consecuencia, los cruzamientos que se destacan por su capacidad combinatoria específica, pueden ser utilizados en la obtención de híbridos; en tanto que los destacados por su capacidad combinatoria general pueden ser utilizados en la obtención de variedades. Las capacidades, combinatoria general y específica, se han encontrado presentes en diversos caracteres, tales como rendimiento y sus componentes, ciclo a espigazón y altura, dependiendo de los progenitores utilizados en los cruzamientos (2, 8, 9, 13, 14)

En este trabajo se investigó la magnitud de la heterosis, valor superior al promedio de los progenitores; y de la heterobeltiosis, valor superior al mejor progenitor del cruzamiento, expresadas en el rendimiento, sus componentes, macollaje, altura y ciclo a espigazón, entre variedades argentinas de trigo.

MATERIALES Y METODOS

Los cruzamientos se realizaron manualmente entre cinco variedades con amplia diversidad genética: Buck Manantial, Buck Ñandú, Dekalb Chañar, Marcos Juárez y Klein Atalaya (Cuadro 1). Además, las variedades diferían genéticamente en altura de planta y ciclo a espigazón. Buck Manantial representó a los genotipos altos, y Buck Ñandú a los bajos; los genotipos restantes eran intermedios. Dekalb Chañar y Buck Manantial representaron a las variedades de ciclo largo, Buck Ñandú a las intermedias, y Marcos Juárez y Klein Atalaya a las de ciclo corto. Los cruzamientos se realizaron durante el año agrícola 1983-84, utilizando un sistema dialelo.

El ensayo realizado con la semilla proveniente de los cruzamientos y los cinco progenitores, se estableció en la Estación Experimental Julio Hirschhorn, de la Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de La Plata, durante el año agrícola 1984-85. El diseño

Cuadro 1. Genealogía de las variedades.

Variedad	Genealogía
Buck Ñandú	[INIA x (Sonora 64 x Tezanos Pinto)] x Yaqui 54
Buck Manantial	Rafaela MAG x Buck Quequén
Dekalb Chañar	[(Yaqui 54 x Kentana 54) x (Africa x Mayo 54) ²] x Ciano
Marcos Juárez INTA	Sonora 64 x Klein Rendidor
Klein Atalaya	No. 66-BV 4A x CC-WF

utilizado fue el de bloques al azar, con cuatro repeticiones. Cada parcela estuvo constituida por un surco con veinticinco semillas distanciadas a cuatro centímetros. El porcentaje de germinación fue superior al 90%. Después de la emergencia de la semilla, se replantó para uniformar la población en las parcelas en que se habían producido deficiencias en el nacimiento. No se aplicaron fertilizantes ni riego adicional.

Se evaluaron los siguientes caracteres: rendimiento por planta (g/planta), número de espiguillas por espiga, número de granos por espiga, peso de mil granos (g), número de macollos, altura de planta (cm) y ciclo a espigazón (días). Las determinaciones se realizaron sobre veinte plantas de cada parcela.

Se determinó el porcentaje de heterosis y heterobeltiosis de los híbridos. La significancia de dichos porcentajes se estimó mediante el método de diferencias mínimas significativas de Duncan. Por el mismo método se compararon las diferencias entre los tratamientos. Además, se calculó el incremento de rendimiento de los híbridos sobre la mejor variedad del ensayo.

Se realizó un análisis de capacidad combinatoria, utilizando el método 2, modelo 1 de Griffing (6)

Se efectuó un análisis de correlación simple entre todos los caracteres estudiados.

RESULTADOS Y DISCUSION

Hubo diferencias significativas entre los genotipos para todos los caracteres en estudio. Al subdividir los grados de libertad de los mismos, se detectaron diferencias entre los progenitores en número de espiguillas por espiga, número de granos por espiga, peso de mil granos, altura de planta y ciclo a espigazón. Los híbridos presentaron diferencias significativas para todos los caracteres (Cuadro 2). En el Cuadro 3, se comparan los valores medios de los progenitores y sus híbridos.

Heterosis

En el Cuadro 4, se presentan los porcentajes para cada uno de los parámetros en cada cruzamiento. Todos los caracteres, con excepción de peso de mil granos y ciclo a espigazón, dieron porcentajes de heterosis significativos en algunos de los híbridos. Para rendimiento, el valor promedio fue de 47.95% con un rango que osciló entre -38.23% y 98.90%. Sólo un cruzamiento fue inferior a la media de sus progenitores, pero no resultó significativo. Seis cruces fueron significativamente superiores. El porcentaje promedio para este carácter se constituyó en el más alto, consi-

Cuadro 2. Cuadrados medios para progenitores e híbridos F₁.

Fuentes de variación	GL	Cuadrados medios							
		Rendimiento	Espiga/planta	Espiguillas/espiga	Granos/espiga	Peso de mil granos	Macollaje	Altura	Ciclo a espigazón
Bloques	3	0.39	0.20	3.14	9.66	20.66*	0.56	53.09	6.82
Genotipos	14	1.94*	1.43**	10.17**	72.02**	85.71**	2.02*	439.08**	147.63**
Progenitores	4	0.47	0.64	7.16**	27.21*	128.66**	0.94	508.79**	284.00**
Híbridos	9	1.85**	1.50**	10.83**	87.13**	75.60**	1.97*	456.38**	70.77**
Progenitores vs híbridos	1	8.63**	3.96**	16.27**	115.27**	4.90	6.93**	4.54	287.17**
Error	42	0.29	0.33	1.18	6.38	5.58	0.61	13.70	1.67
CV (%)		23.30	20.39	2.66	10.54	6.87	20.60	4.21	1.65

derando todas las determinaciones realizadas, demostrando una tendencia favorable de los híbridos al compararlos con el promedio de sus respectivos progenitores. Coincidentemente con los resultados obtenidos, numerosos investigadores han encontrado heterosis para rendimiento en algunos de los cruzamientos realizados entre progenitores con amplia diversidad genética, tal como ha sido señalado por Patterson y Bitzer (11) y Wilson (15).

El número de espigas por planta presentó un promedio de 23% sobre la media de los padres, variando entre -29% y 55.30%. Hubo un sólo valor inferior al promedio de los progenitores que no resultó significativo. Tres híbridos alcanzaron diferencias altamente significativas. Otros investigadores que coinciden con estos resultados, han encontrado heterosis para este carácter en algunos de los cruzamientos (4, 9).

En el número de espiguillas por espiga, el porcentaje promedio de heterosis fue bajo (7.98%), con un

rango que osciló entre -9.6% y 19.64%. Tres valores fueron inferiores al promedio de los progenitores, pero no tuvieron significancia. En cambio, seis cruzamientos dieron diferencias significativas sobre la media de sus respectivos progenitores. Nettevic (10) también encontró heterosis para este carácter.

El valor medio de los porcentajes de heterosis de número de granos por espiga fue de 12.75%, con valores que oscilaron entre -16.86% y 39.56%. Un híbrido dio valores significativamente inferiores, con respecto al promedio de sus respectivos progenitores, y siete fueron significativamente superiores. Concuerdan con estos resultados, Chowdhry *et al.* (4) y Rai y Stoskopf (12) quienes señalaron la presencia de heterosis para este carácter. Otros investigadores han encontrado porcentajes de heterosis poco frecuentes (9, 10).

El peso de mil granos tuvo una media de 1.76%, con una amplitud de -8.44% a 8.15%. No hubo nin-

Cuadro 3. Valores medios de los progenitores y sus híbridos.

Genotipo	Rendimiento	Espigas/planta	Espiguillas/espiga	Granos/espiga
Buck Ñandú	1.61 ab	2.17 ab	16.22 efg	25.25 cde
Buck Manantial	1.74 abc	2.43 abcd	13.85 bc	22.52 abcde
Dekalb Chañar	1.36 a	2.28 abc	13.75 bc	23.02 bcde
Marcos Juárez	2.28 bcde	3.17 cdef	12.53 ab	18.24 ab
Klein Atalaya	1.89 abcd	2.29 abc	14.19 bed	20.88 abc
Buck Ñandú x Buck Manantial	2.85 e	2.73 abcd	17.59 g	33.33 f
Buck Ñandú x Dekalb Chañar	2.60 cde	2.84 abcde	16.9 g	28.1 def
Buck Ñandú x Marcos Juárez	2.29 bcde	2.78 abcde	13.93 bc	20.79 abc
Buck Ñandú x Klein Atalaya	1.87 abcd	2.44 abcd	13.83 bc	21.95 abcde
Buck Manantial x Dekalb Chañar	2.40 bcde	3.38 def	16.51 fg	28.37 ef
Buck Manantial x Marcos Juárez	2.73 de	3.01 bcde	15.45 cdef	24.80 cde
Buck Manantial x Klein Atalaya	3.60 f	3.66 ef	15.94 defg	26.23 cde
Dekalb Chañar x Marcos Juárez	3.42 ef	4.05 f	15.23 cdef	24.16 bcde
Dekalb Chañar x Klein Atalaya	2.76 de	3.31 def	14.72 cde	25.38 cde
Marcos Juárez x Klein Atalaya	1.28 a	1.94 a	12.08 a	16.27 a

Continuación Cuadro 3.

Genotipo	Peso de mil granos	Macollaje	Altura	Ciclo a espigazón
Buck Ñandu	34.55 bed	2.79 ab	75.69 a	78.25 c
Buck Manantial	31.30 ab	3.36 abed	105.94 g	89.75 f
Dekalb Chañar	25.83 a	3.11 abe	84.58 cd	91.25 f
Marcos Juárez	39.40 d	4.09 bedef	83.02 cd	75.00 b
Klein Atalaya	39.03 d	3.45 abede	88.30 d	73.25 ab
Buck Ñandú x Buck Manantial	30.9 ab	3.77 abedef	95.52 e	80.75 d
Buck Ñandú x Dekalb Chañar	32.64 bc	3.86 abedef	82.12 c	80.75 d
Buck Ñandú x Marcos Juárez	39.13 d	3.88 abedef	76.54 ab	72.50 a
Buck Ñandú x Klein Atalaya	35.07 bed	3.03 abe	81.59 bc	73.50 ab
Buck Manantial x Dekalb Chañar	25.41 a	4.24 edef	100.08 ef	85.50 e
Buck Manantial x Marcos Juárez	36.97 bed	3.87 abedef	97.18 e	74.00 ab
Buck Manantial x Klein Atalaya	37.07 cd	4.98 abedef	105.02 fg	74.25 ab
Dekalb Chañar x Marcos Juárez	34.80 bed	4.69 ef	84.51 cd	74.75 b
Dekalb Chañar x Klein Atalaya	33.48 bc	4.58 def	86.32 cd	77.25 c
Marcos Juárez x Klein Atalaya	40.46 d	2.75 a	72.87 a	74.75 b

Las medias en la misma columna, seguidas por la misma letra, no difieren estadísticamente entre sí, de acuerdo al test de Rango Múltiple de Duncan ($P \leq 0.05$)

gún cruzamiento con un porcentaje significativo de heterosis. Rai y Stoskopf (12) coinciden con estos resultados. Sin embargo, Müller *et al* (9) y Nettevic (10), encontraron heterosis significativa para este carácter.

El macollaje tuvo un promedio de 18.77%, con un rango que varió entre -27.06% y 46.04%. Dos cruzamientos dieron valores inferiores a la media de sus progenitores, pero no resultaron significativos. Tres híbridos fueron significativamente superiores al promedio de sus progenitores. Rai y Stoskopf (12) también encontraron porcentajes significativos de heterosis en sus cruzamientos.

En el carácter altura, el porcentaje promedio fue de 0.53%, oscilando entre -15% y 8.13%, de manera

que en general no hubo manifestación de heterosis. Sólo un cruzamiento fue superior a la media de sus progenitores y otro significativamente inferior. Algunos de los cruzamientos se acercaron al progenitor más alto y otros al más bajo, pero sin desviarse significativamente del promedio. Sólo un híbrido fue notoriamente más pequeño que el más bajo de sus progenitores. Sin embargo, con otro germoplasma, se han encontrado porcentajes variables de heterosis para este carácter (1, 2, 3, 4).

Con respecto al ciclo a espigazón, el valor promedio fue de -5.6%; el rango varió entre -10.16% y 0.85%. Ninguno de los híbridos manifestó heterosis significativa para este carácter; en cambio, nueve valores fueron significativamente inferiores al promedio de sus progenitores. La mayor parte de los cruzamien-

Cuadro 4. Porcentaje de heterosis en los híbridos F₁.

Híbridos	Porcentaje de heterosis			
	Rendimiento	Espiga/planta	Espiguilla/espiga	Granos/espigas
Buck Ñandú x Buck Manantial	70.15**	18.59	17.01**	39.56**
Buck Ñandú x Dekalb Chañar	75.67**	27.54	12.74*	16.42*
Buck Ñandú x Marcos Juárez	17.74	4.12	-3.10	-4.38
Buck Ñandú x Klein Atalaya	6.86	9.14	-9.03	4.90
Buck Manantial x Dekalb Chañar	54.84*	43.48**	19.64**	22.38**
Buck Manantial x Marcos Juárez	35.82	7.60	17.15**	21.70**
Buck Manantial x Klein Atalaya	98.90**	55.30**	13.73*	20.87**
Dekalb Chañar x Marcos Juárez	87.91**	48.62	15.89**	17.11*
Dekalb Chañar x Klein Atalaya	69.85**	44.59**	5.37	15.59*
Marcos Juárez x Klein Atalaya	-38.23	-29.00	-9.60	-16.86*
Promedio	47.95	23.00	7.98	12.75

Continuación Cuadro 4.

Híbridos	Porcentaje de heterosis			
	Peso de mil granos	Macollaje	Altura	Ciclo a espigazón
Buck Nándú x Buck Manantial	-6.14	22.80	5.18	-3.87**
Buck Nándú x Dekalb Chañar	8.15	30.85	2.47	-4.72**
Buck Nándú x Marcos Juárez	5.81	12.79	-3.56	-5.23**
Buck Nándú x Klein Atalaya	-4.70	-2.89	-0.50	-2.93*
Buck Manantial x Dekalb Chañar	-8.44	31.27	5.06	-5.52**
Buck Manantial x Marcos Juárez	4.58	4.03	2.86	-10.16**
Buck Manantial x Klein Atalaya	5.43	46.04**	8.13*	-8.90**
Dekalb Chañar x Marcos Juárez	6.72	30.28*	0.85	-10.07**
Dekalb Chañar x Klein Atalaya	3.05	39.63*	-0.14	-6.08**
Marcos Juárez x Klein Atalaya	3.19	-27.06	-15.00*	0.85
Promedio	1.76	18.77	0.53	-5.60

* Significativo $P \leq 0.05$ ** Significativo $P \leq 0.01$

tos tuvo un ciclo más largo que el progenitor más precoz, pero se acercaron a él. Tres de ellos fueron de ciclo más corto que el progenitor más precoz, dos de los cuales dieron significancia. Estos resultados coinciden con los encontrados por otros investigadores (2, 10)

Tal como se ha señalado, la mayor parte de los investigadores han encontrado heterosis significativa para rendimiento. Sin embargo, no hay coincidencia en lo que sucede en los componentes del rendimiento. Ello indica que estos últimos han tenido una incidencia distinta en el incremento del rendimiento en los diversos trabajos realizados al respecto. En este trabajo se ha señalado que, si bien varios híbridos presentan valores superiores al promedio de los progenitores en el carácter rendimiento, el peso de mil granos no dio valores significativos de heterosis en ninguno de

los cruzamientos. Esto muestra la baja incidencia de este componente en el incremento del rendimiento.

Por otra parte, el análisis de correlación simple entre los ocho caracteres en estudio, incluyendo progenitores e híbridos (Cuadro 5), señala que el peso de mil granos y el ciclo a espigazón no estuvieron correlacionados con el rendimiento. El número de espigas por planta, número de espiguillas por espiga, número de granos por espiga, macollaje y altura de planta, presentaron correlaciones positivas y altamente significativas.

Heterobeltiosis

Los porcentajes alcanzados y su significancia se indican en el Cuadro 6. Para rendimiento, el porcentaje promedio fue de 31.29%, con un rango que osci-

Cuadro 5. Coeficientes de correlación simple entre los caracteres en estudio.

Variable	Espiga/planta	Espiguilla/espiga	Granos/espiga	Ciclo a espigazón	Macollaje	Altura	Rendimiento/planta
Peso de mil granos	-0.13	-0.36	-0.51	-0.72	-0.08	-0.35	-0.01
Espigas/planta		0.30	0.32	-0.18	0.81	0.40	0.84
Espiguillas/espiga			0.75	0.14	0.27	0.36	0.45
Granos/espiga				0.27	0.39	0.46	0.57
Ciclo a espigazón					-0.20	0.32	-0.28
Macollaje						0.45	0.84
Altura							0.47

r ≤ 0.31 significativo $P \leq 0.05$

Cuadro 6. Porcentaje de heterobeltiosis en los híbridos F₁.

Híbridos	Porcentajes de heterobeltiosis			
	Rendimiento	Espiga/planta	Espiguillas/espiga	Granos/espiga
Buck Ñandú x Buck Manantial	63.79**	12.35	8.45	32.00**
Buck Ñandú x Dekalb Chañar	49.43*	24.56	4.19	11.29
Buck Ñandú x Marcos Juárez	0.44	-12.30	-14.12**	-17.66**
Buck Ñandú x Klein Atalaya	-1.06	6.55	-14.73**	-13.07*
Buck Manantial x Dekalb Chañar	37.93	38.52*	19.21**	23.24**
Buck Manantial x Marcos Juárez	19.74	-5.05	11.55*	10.12
Buck Manantial x Klein Atalaya	90.48**	50.62**	12.33**	16.47*
Dekalb Chañar x Marcos Juárez	50.00**	27.76	10.76	4.95
Dekalb Chañar x Klein Atalaya	46.03*	44.54*	3.73	10.25
Marcos Juárez x Klein Atalaya	-43.86*	-38.80**	-14.87**	-22.08**
Promedio	31.29	14.87	3.87	5.55

Continuación Cuadro 6.

Híbridos	Porcentajes de heterobeltiosis			
	Peso de mil granos	Macollaje	Altura	Ciclo a espigazón
Buck Ñandú x Buck Manantial	-10.56*	12.20	-9.84**	-10.03**
Buck Ñandú x Dekalb Chañar	-5.53	24.12	-2.91	-11.51**
Buck Ñandú x Marcos Juárez	-0.69	-5.13	-7.81*	-7.35**
Buck Ñandú x Klein Atalaya	-10.15*	-12.17	-7.60*	-6.07**
Buck Manantial x Dekalb Chañar	-18.22**	26.19	-5.53	-6.30**
Buck Manantial x Marcos Juárez	-6.17	-5.38	-8.27**	-17.55**
Buck Manantial x Klein Atalaya	-5.02	44.35**	-0.87	-17.27**
Dekalb Chañar x Marcos Juárez	-11.68**	14.67	-0.08	-18.08**
Dekalb Chañar x Klein Atalaya	-14.22**	32.75*	-2.24	-15.34**
Marcos Juárez x Klein Atalaya	2.69	-32.76*	-17.47**	-0.33
Promedio	-8.01	9.88	-6.26	-10.98

* Significativo P ≤ 0.05

** Significativo P ≤ 0.01

ló entre -43.86% y 90.48%. Esto lo convierte en el promedio más alto, considerando todos los caracteres en estudio. Cinco cruzamientos fueron significativamente superiores al mejor progenitor y uno fue significativamente inferior. Por otra parte, los cinco híbridos que manifestaron heterobeltiosis también fueron superiores a la mejor variedad del ensayo, denominada Marcos Juárez. Los resultados obtenidos coinciden con lo señalado por Müller *et al.* (9). Sin embargo, Bitzer y Fu (2) determinaron que, dentro de su germoplasma, los híbridos no fueron significativamente superiores al mejor progenitor.

Para número de espigas por planta, el promedio fue de 14.87%, con un rango que varió entre -38.30% y 50.62%. Tres cruzamientos fueron significativamente superiores al mejor progenitor y tres significativamente inferiores.

En número de espiguillas por espiga, el porcentaje promedio fue de 3.87%, oscilando entre -14.87% y 19.21%. Tres valores resultaron significativamente superiores al mejor progenitor y tres significativamente inferiores.

Para número de granos por espiga, el promedio fue de 5.55%, con un rango que varió entre -22.08% y 32%. Tres híbridos fueron significativamente superiores al mejor progenitor y tres significativamente inferiores.

Para peso de mil granos, el promedio fue de -8.01% y el rango varió entre -18.22% y 2.69%, señalando una clara tendencia a disminuir sus valores con respecto al mejor de sus progenitores. Cinco híbridos fueron significativamente inferiores en relación al progenitor de mayor peso.

Si bien hay trabajos que señalan la presencia de heterobeltiosis en rendimiento, es poco frecuente que los cruzamientos superen al mejor progenitor en componentes del rendimiento. Sin embargo, como ya ha sido señalado en este trabajo, se encontró heterobeltiosis significativa en número de espigas por planta, número de espiguillas por espiga y número de granos por espiga en algunos de los híbridos.

Para el carácter macollaje, el promedio fue de 9.88% y la amplitud osciló entre -32.76% y 44.35%. Un cruzamiento fue significativamente inferior al mejor de sus progenitores y dos fueron significativamente superiores.

En altura, el promedio fue de -6.26%, variando entre -17.47% y -0.08%, de manera que todos los híbridos dieron valores inferiores a su progenitor más alto, siendo cinco de ellos significativos. Estos resultados coinciden con lo señalado por Bitzer y Fu (2). Brown *et al.* (3), en cambio, encontraron que algunos híbridos superaron al progenitor más alto.

En ciclo a espigazón, el porcentaje promedio fue de -10.98%, con un rango que osciló entre -18.08% y -0.33%. Por lo tanto, tampoco se manifestó heterobeltiosis significativa para este carácter en ninguno de los cruzamientos. Con excepción de uno de ellos, todos los híbridos dieron valores significativamente inferiores al progenitor de ciclo más largo.

Capacidad combinatoria

En el Cuadro 7 se indican los cuadrados medios de capacidad combinatoria general (CCG) y específica (CCE), y su significancia para cada uno de los caracteres en estudio.

La CCG fue significativa para todos los caracteres, excepto rendimiento y macollaje. Müller *et al.* (9) encontraron CCG significativa en número de espigas por planta, rendimiento, número de granos por espiga y

peso de mil granos. Bitzer y Fu (2) señalaron que la CCG fue significativa para la mayoría de los caracteres estudiados.

La CCE fue significativa para todos los caracteres en estudio. En diversos trabajos se ha señalado la presencia de CCE en distintos caracteres, según el germoplasma utilizado. Müller *et al.* (9) encontraron CCE significativa en rendimiento y número de granos por espiga. Walton (14) señaló que la CCE fue significativa en rendimiento. Singh *et al.* (13) determinaron que existió CCE en rendimiento, número de espigas y macollaje. Sin embargo, Bitzer y Fu (2) señalaron que la CCE no estuvo presente en la mayor parte de los caracteres estudiados.

Los estimadores de los efectos de CCG se incluyen en el Cuadro 8. Se observó que las variedades Buck Manantial y Dekalb Chañar, presentaron valores positivos para la mayor parte de los caracteres, lo que indica que dichos genotipos, en sus combinaciones híbridas, tienen un comportamiento superior al promedio de todos sus cruzamientos. Los valores negativos, por el contrario, indican que el genotipo presenta un comportamiento inferior.

Los estimadores de los efectos de CCE se presentan en el Cuadro 9. Hubo algunos cruzamientos que manifestaron buena CCE para la mayoría de los caracteres. Este es el caso de los híbridos Buck Manantial x Klein Atalaya, Dekalb Chañar x Marcos Juárez, Buck Ñandú x Dekalb Chañar, Dekalb Chañar x Klein Atalaya, y Buck Ñandú x Buck Manantial. En estos cruzamientos se estaría manifestando la acción génica no aditiva y no aditiva x ambiente, en tanto que en aquellas variedades que demostraron buena CCG, se habría manifestado con mayor intensidad la acción génica aditiva y la interacción aditiva x ambiente.

Las relaciones CCG/CCE (Cuadro 7) indican que la CCG tuvo mayor importancia que la CCE en el número de espiguillas por espiga, número de granos por es-

Cuadro 7. Cuadrados medios de capacidad combinatoria general y específica (CCG y CCE).

Fuente de variación	Cuadrados medios CCG y CCE								
	GL	Rendimiento	Espiga/planta	Espiguillas/espiga	Granos/espiga	Peso de mil granos	Macollaje	Altura	Ciclo de espigazón
CCG	4	0.36	1.08*	17.48**	140.50**	266.80**	1.26	1.336.60**	385.35**
CCE	10	2.58**	2.00**	7.26**	44.70**	13.29*	2.13**	80.20**	52.60**
Error	42	0.29	0.33	1.18	6.35	5.58	0.61	13.70	1.67
CCG/CCE		0.14	0.54	2.41	31.43	20.08	0.59	16.67	7.33

Significativo $P \leq 0.05$

Significativo $P \leq 0.01$

Cuadro 8. Estimaciones de los efectos de capacidad combinatoria general (CCG) de los progenitores.

Progenitores	Efectos de capacidad combinatoria general (CCG)							
	Rendimiento	Espiga/planta	Espiguillas/ espiga	Granos/espiga	Peso de mil granos	Macollaje	Altura	Ciclo de espigazón
Buck Ñandú	-0.15	-0.26	0.80	1.56	0.06	-0.35	-5.80	-0.89
Buck Manantial	0.17	0.09	0.59	2.01	-1.92	0.14	11.71	3.40
Dekalb Chañar	0.004	0.16	0.25	1.19	-4.06	0.14	-0.79	4.36
Marcos Juárez	0.06	0.16	-1.05	-3.03	3.39	0.11	-4.37	-3.43
Klein Atalaya	-0.08	-0.15	-0.59	-0.01	2.53	-0.05	-0.77	-3.42

Cuadro 9. Estimaciones de los efectos de capacidad combinatoria específica (CCE) de los híbridos F₁.

Progenitores	Variables	Efectos de capacidad combinatoria específica (CCE)			
		Progenitores			
		Buck Manantial	Dekalb Chañar	Marcos Juárez	Klein Atalaya
Buck Ñandú	Rendimiento	0.52	0.45	0.07	-0.21
	Espigas/planta	0.07	0.10	0.05	0.02
	Espiguillas/espiga	1.69	1.00	-0.67	-0.62
	Granos/espiga	5.80	1.39	-1.70	-1.93
	Peso de mil granos	-1.64	2.23	1.27	-1.93
	Macollaje	0.22	0.30	0.36	-0.33
	Altura	1.65	0.75	-1.26	0.19
	Ciclo a espigazón	-0.13	-1.09	-1.52	0.69
Buck Manantial	Rendimiento		-0.09	0.19	1.20
	Espigas/planta		0.29	-0.08	0.58
	Espiguillas/espiga		0.83	1.07	1.10
	Granos/espiga		1.22	1.87	2.00
	Peso de mil granos		-3.01	1.10	2.06
	Macollaje		0.19	-0.15	1.12
	Altura		1.20	1.88	6.11
	Ciclo a espigazón		-0.63	-5.11	-4.86
Dekalb Chañar	Rendimiento			1.04	0.53
	Espigas/planta			0.89	0.46
	Espiguillas/espiga			1.18	0.22
	Granos/espiga			2.04	1.97
	Peso de mil granos			1.06	0.60
	Macollaje			0.67	0.73
	Altura			1.71	-0.09
	Ciclo a espigazón			-4.09	-2.06
Marcos Juárez	Rendimiento				-1.01
	Espigas/planta				-0.90
	Espiguillas/espiga				-1.12
	Granos/espiga				-2.92
	Peso de mil granos				0.13
	Macollaje				-1.08
	Altura				-9.96
	Ciclo a espigazón				3.27

piga, peso de mil granos, altura y ciclo a espigazón. La CCE fue preponderante en el rendimiento, número de espigas por planta y macollaje.

CONCLUSIONES

Los híbridos Buck Manantial x Klein Atalaya, Buck Ñandú x Buck Manantial, Dekalb Chañar x Marcos Juárez, Buck Ñandú x Dekalb Chañar y Dekalb Chañar x Klein Atalaya, mostraron altos porcentajes de heterosis y heterobeltiosis, y alta CCE para la mayor parte de los caracteres, por lo que pueden ser utilizados en la producción de híbridos, desde el punto de vista de su rendimiento.

Los incrementos en el rendimiento de los híbridos se debieron fundamentalmente al aumento en el número de espigas por planta, número de espiguillas por

espiga y, consecuentemente, al número de granos por espiga. El componente peso de mil granos no tuvo incidencia en dicho incremento.

No es factible esperar incrementos o reducciones en altura con respecto al promedio de los progenitores, dentro de estas combinaciones híbridas.

El ciclo de los híbridos se acercó al del progenitor más precoz.

Los cultivares Buck Manantial y Dekalb Chañar pueden ser utilizados en la obtención de nuevas variedades por su alta CCG, en la mayoría de los caracteres.

La preponderancia de la acción génica aditiva o no aditiva dependió del carácter en estudio.

LITERATURA CITADA

- 1 ANWAR, A R ; CHOWDRHY, S.H. 1969. Heritability and inheritance of plant height, heading date and grain yield in four spring wheat crosses. *Crop Science* 9:760-761
- 2 BITZER, M J ; FU, S.H. 1972. Heterosis and combining ability in Southern Soft Red Winter Wheat. *Crop Science* 12:35-37.
- 3 BROWN, C.M.; WEIBEL, R.O.; SEIF, R.D. 1986. Heterosis and combining ability in common winter wheat. *Crop Science* 6:382-383.
- 4 CHOWDHRY, A R.; MOHAMMAD, A.; QAZI, M. s.f. Heterosis for grain yield and its components in spring wheat crosses. *Experimental Agriculture* 8:235-239
- 5 FALCONER, D.S. 1967. Introduction to quantitative genetics. New York, Ronald Press 365 p.
- 6 GRIFFING, B. 1956. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. *Australian Journal of Biological Science* 9:463-493
- 7 HAYMAN, B.I. 1954. The theory and analysis of diallel crosses (I). *Genetics* 39:789-809
- 8 KALTSIKES, P.J.; LEE, J. 1971. Quantitative inheritance in durum wheat. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 13:210-218
- 9 MULLER, C.; CORTAZAR, R.; PARODI, P.; ALVARADO, P. 1971. Vigor híbrido, capacidad combinatoria y acción génica en seis genotipos de trigo (*T. aestivum* L.) para rendimiento y componentes de rendimiento. *Agricultura Técnica* 31:59-70.
- 10 NETTEVIC, E.D. 1969. The study of spring wheat hybrid in connection with the use of heterosis. *Selskozyaitvennaya Biologiya* 4:332-340
- 11 PATTERSON, F.L.; BITZER, M.J. 1966. Purdue University Research Program Reporter no. 222. p. 104.
- 12 RAI, R.K.; STOSKOPF, N.C. 1970. Studies with hybrid wheat in Ontario. *Canadian Journal of Plant Science* 50:485-491.
- 13 SINGH, P.V.; SINGH, M.B.; AHMAD, Z.; KHANA, A.N. 1973. Combining ability study on some developmental traits related to yield productivity in bread wheat. *Indian Journal of Farm Sciences* 1:21-28
- 14 WALTON, P.D. 1971. Heterosis in spring wheat. *Crop Science* 11:422-424
- 15 WILSON, J.A. 1968. Problems in hybrid wheat breeding. *Euphytica* 17:13-32

Electroforesis de Proteínas y Esterasas como Método Químico de Identificación en Papas¹

A Contreras*, R Mansilla*

ABSTRACT

A chemical technique for rapid clone identification of potatoes, based on protein and esterase electrophoresis, was tested. The Stegemann technique was used with three potato groups, which, under field conditions, presented similar appearances. The experiment was carried out with ripe potatoes, stored for a maximum of three weeks. The method tested proved to be accurate and rapid.

INTRODUCCION

El hombre permanentemente utiliza los avances científicos y tecnológicos que ocurren en diversas disciplinas. Es así como la electroforesis, que ha alcanzado un desarrollo muy importante como método de investigación en biología, bioquímica y medicina, en la actualidad recurren a ella diversos agrónomos con gran éxito en la identificación de diversas especies vegetales

De acuerdo a su potencial genético, las diversas especies vegetales desarrollan sustancias químicas específicas a una especie y/o determinada variedad, detectables según un adecuado proceso electroforético. De este modo, la estabilidad de proteínas y enzimas solubles en agua, como en el caso de las papas, ha brindado una excelente posibilidad de ser utilizadas en estudios taxonómicos a través de este método (2, 7, 9, 14). Así se ha llegado a establecer patrones más fijos, comparables y objetivos para estos fines y que superan las simples apreciaciones personales subjetivas sobre las características morfológicas entre variedades de una misma especie.

La colección de papas de la Universidad Austral de Chile, con más de 600 entradas, presenta clones que a simple vista parecieran ser similares; sin embargo, su posible eliminación sólo se podrá realizar en la

COMPENDIO

El presente estudio pretende probar la eficiencia de la electroforesis de proteínas y esterasesas como una técnica química que permita acelerar el proceso de identificación de clones de papas. Se usó la técnica de Stegemann en tres agrupaciones de papas que, en el campo, presentaron una apariencia similar. Esta se realizó en material maduro que no estuvo almacenado más de tres semanas. Se comprobó la eficiencia del método en cuanto a rapidez y resolución.

medida que se obtenga un método confiable para evitar la pérdida de material genético. El objetivo de este trabajo fue probar la tecnología de electroforesis, recomendada por Stegemann y Loeschke (14) con modificaciones de Stegemann y Schnik (15), con el fin de obtener patrones confiables de identificación.

REVISION DE LITERATURA

El principio básico de la electroforesis consiste en la migración de partículas coloidales, tales como las proteínas por ejemplo, como consecuencia de ser sometidas a un campo eléctrico. Esta migración depende principalmente de la carga eléctrica neta de la partícula o molécula, de su configuración, grado de disociación, pH y el tipo o medio de soporte que se utilice.

Para que ocurra este proceso, las partículas a investigar deben tener una polaridad que sea susceptible al campo eléctrico que se aplica. En el caso de las proteínas o enzimas, la presencia de los grupos terminales de los aminoácidos que las constituyen determinan la carga de ellas. Es así como el grupo básico amino (NH_2), cuando está en solución, capta un hidrógeno del medio haciéndose positivo (NH_3^+); a la inversa, el grupo ácido (COOH) cede un hidrógeno haciéndose negativo (COO^-).

La predominancia, entonces, de un tipo de aminoácido en las partículas, ya sea ácido o básico, determinará la carga neta de ellas. De esta manera, se seleccionará el pH del medio que conviene utilizar para que la migración sea óptima, puesto que, según el pH aplicado, se tendrá la polaridad del campo eléctrico.

¹ Recibido para publicación el 2 de setiembre de 1988. Proyecto financiado por Fondecyt y Dirección de Investigación, UACH, Chile.

* Profesor y Químico laboratorista. Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, Universidad Austral de Chile, Casilla 567, Valdivia, Chile.

Estas partículas que han migrado, de acuerdo a las condiciones del proceso electroforético, tendrán características específicas tales como tamaño, intensidad, distancia del origen, número para cada variedad y que serán reveladas con los colorantes apropiados (9, 16).

La electroforesis ha sido adaptada a una variada gama de aplicaciones. En biología, la electroforesis es usada para comparar las posibles relaciones evolutivas entre organismos, asumiendo que tipos relacionados estrechamente pueden tener un gran número de proteínas del mismo grupo y viceversa. Para tipos sin relación

En medicina, se analiza una serie de enzimas relacionadas con distintas patologías, como, asimismo, la presencia de antígenos a través de la inmunoelectroforesis.

En bioquímica, se han utilizado, para analizar proteínas y ácidos nucleicos virales, componentes celulares y otros sistemas biológicos.

En estudios agronómicos realizados para la identificación de variedades a través de proteínas, la electroforesis ha sido usada en arroz (*Oryza* spp.), cebada (*Hordeum* spp.), maíz (*Zea mays*), poroto (*Phaseolus vulgaris*), raps (*Brassica napus*), papa (*Solanum* spp.) y trigo (*Triticum* spp.) con base en los postulados de Stegemann y Loeschcke (14).

En Chile, se han identificado clones de papas pertenecientes a una misma agrupación morfológica, así como también a agrupaciones distintas (3, 6).

También, la electroforesis ha sido usada para el diagnóstico de la enfermedad de la papa denominada "tubérculo ahusado" (PSTV), la cual permite detectar el viroide (8). Igualmente, para identificar razas del virus Y de la papa (1).

A través de este método González (5), identificó 52 cultivares de trigo panadero y candeal que son más comunes en Chile.

En el caso de la investigación clonal de papas, relativo a la identificación a través de las proteínas, éstas se caracterizan por la presencia de todas o alguna de cuatro bandas principales, ubicadas en el tercio superior del sector catódico del gel de soporte y por muchas bandas finas en el sector anódico.

Conjuntamente a la investigación proteínica, es necesario estudiar los espectros de esterasas que dan una certidumbre adicional a lo anterior, ya que están aún menos influidas por la brotación que las proteínas en el proceso de almacenamiento.

Los espectros de las proteínas, más los de esterasas, permiten una clara identificación de la variedad o clon a identificar (2, 4, 15).

Uso de la electroforesis en la identificación de variedades de papa

Para identificar variedades de papa, en forma eficiente y efectiva se requieren características estables, preferiblemente de los tubérculos. La electroforesis en patrones de proteína ha sido utilizada exitosamente en papa por numerosos investigadores durante más de diez años (4, 10, 13, 17).

Contreras *et al.* (3) indican que la clasificación de papas por el método de la electroforesis es indispensable para programas eficientes y efectivos de identificación clonal, ya que se puede comparar la identidad de clones pertenecientes a una misma agrupación morfológica, como también a agrupaciones distintas.

En el proceso de electroforesis es importante que los tubérculos a usar estén maduros, pues si éstos están inmaduros los patrones individuales son menos pronunciados y además, se presenta una banda predominante (12, 13, 14).

Se ha constatado que las bandas proteínicas persisten, aún cuando el material se cultive bajo distintas condiciones ecológicas y biológicas (14, 17).

Además, no se han logrado probar en forma fehaciente, que los patrones electroforéticos proteínicos sean modificados, en forma notoria, por el almacenamiento de papas hasta un periodo de seis meses, tiempo en que comienza la brotación (13, 14, 17).

La identificación de una variedad desconocida se inicia por su espectro de proteínas. De acuerdo a la presencia o ausencia de las cuatro bandas principales (A, B, C, D) que se ubican en el tercio cercano al punto de partida (catódico), se puede incluir a la variedad dentro de una de las nueve posibles combinaciones (14) (ver Cuadro 1).

Sin embargo, dentro de cada combinación, existen variedades y clones distintos ya que la intensidad de las bandas principales puede presentarse en gradiente. Por ello, debe posteriormente y dentro de las claves específicas, analizarse el grado de estas bandas, como también las bandas delgadas del sector anódico. Una identificación de esterasas de este sector, ayuda en el análisis de identificación, ya que por lo general, las bandas proteínicas delgadas son poco nítidas (11, 14).

Cuadro 1. Clasificación de foregramas de papas.

Zona	Claves o combinaciones								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	-	-	-	-	+	+	+	+	+
B	+	+	+	+	+	+	+	+	-
C	-	-	+	+	-	-	+	+	+
D	-	+	-	+	+	-	-	+	-

Ventajas de la electroforesis. Según Stegemann y Loeschke (14), las ventajas de este método son:

- El análisis es rápido. El período entre la toma de muestra y la obtención de resultados es de 24 horas.
- Evita duplicaciones del material clonal.
- Posibilita agrupar clones según bandas electroforéticas.
- Las papas se pueden guardar por un periodo de seis meses a una temperatura entre 4 a 10°C; durante este período, no se registran cambios en los espectros electroforéticos.
- Se requiere de una reducida cantidad del tubérculo, aproximadamente, de 1 g de cualquier sector de éste.
- No existe influencia del clima, del suelo, de tratamientos con reguladores de crecimiento ni de fertilizantes, con respecto a los espectros electroforéticos.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron nueve clones de papa de la colección chilena, los cuales fueron previamente procesados en el campo, para formar grupos de clones con caracteres morfológicos más o menos similares. De acuerdo con el número de clones, se pudieron procesar todos los clones en un mismo gel para proteínas y en otro para las respectivas esterasas, de acuerdo a la metodología utilizada por Stegemann y Schnick (15)

Los grupos fueron: (1) UA1005; UA1015 y UA1199
 (2) UA1008; UA1009 y UA1011
 (3) UA1363 y UA1384

El clon UA 1388 se usó como patrón de referencia por poseer cuatro bandas principales en el sector catódico.

El equipo utilizado fue el PANTA-PHOR recomendado por Stegemann y Loeschke (14)

Tanto para espectro proteinicos como para esterasas, se trabajó con savia obtenida de tubérculos maduros previamente refrigerados a 20°C. Los tubérculos se descongelaron, descortezaron y trituraron en una picadora Moulinex con 0.05 ml de solución de sulfito/bisulfito de sodio (10 g/7.5 g/50 ml agua) por cada 10 ml de savia con el objeto de inhibir oxidaciones enzimáticas. La mezcla que se obtiene por filtración se centrifuga a 3000 rpm por 15 minutos, separándose la savia (sobrenadante) del almidón (residuo).

Como medio separador se utilizó un gel de poliacrilamida (5.6% de acrilamida, 0.3% de metileno-bisacrilamida). La solución monomérica se polimerizó con themed y persulfato de amonio e inmediatamente se vació en una placa de electroforesis vertical PANTA-PHOR. Esta placa se conectó a una fuente de poder Labor Müller que controló la intensidad de la corriente para el proceso (intensidad no superior a 65 mA en proteínas, ni a 75 mA en esterasas).

Como solución conductora de la tensión se utilizó un buffer pH 7.9 de TRIS/borato en proteínas y pH 8.9 también de TRIS/borato de esterasas

La muestra aplicada por cada una de las 10 ranuras del gel fue de 5 microlitros de una solución compuesta de 0.8 ml de savia más 0.2 ml de solución de amido negro como tinción marcadora.

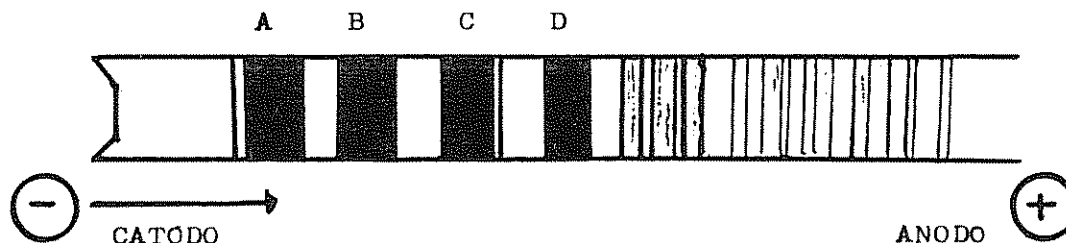


Fig 1. Esquema típico de un foregrama de papa con sus cuatro bandas principales A, B, C, D (patrón)

Cuadro 2. Identificación de papas usando patrones electroforéticos en gel de poliacrilamida.

Número de entrada	Bandas tipo	Clave	Identidad
UA 1388	A B C D	8	A
UA 1015	B C D	4	Ba
UA 1199	B C D	4	Ba
UA 1005	B C D	4	Ba
UA 1008	B C D	4	Bb
UA 1011	B C D	4	Bb
UA 1009	B C D	4	Bb
UA 1363	A B	6	Cc
UA 1364	A B	6	Cc

La temperatura del proceso se mantuvo constante a 20°C. Asimismo, se utilizó una bomba peristáltica que recirculó el "buffer" para poder mantener una concentración constante del mismo, tanto en el sector catódico como anódico.

Aplicada la intensidad de la corriente necesaria, las partículas migraron del cátodo al ánodo, en un proceso que duró aproximadamente 1 hora y 30 minutos.

Para revelar las proteínas contenidas en el gel se utilizaron 400 ml de una solución que contiene ácido tricloroacético, metanol, ácido acético, agua y 5 ml de la tinción azul de Coomassie al 1% por 16 horas.

Como solución de desteñido del exceso de colorante, el gel se lavó con una disolución que contiene metanol, ácido acético y agua, en un volumen de 300 ml, por 3 a 4 veces, cada 2 horas.

Finalmente, en esta forma, las proteínas pudieron ser fotografiadas y evaluadas.

En cuanto a las esterasas, éstas se tiñeron con 200 ml "buffer" fosfato a pH 7.2 a la cual se le agregaron 40 mg de alpha-naftil acetato. El alpha-naftol liberado se acopla a la sal de diazonio estable Fast Blue-RR (100 mg) que se agregó posteriormente. Esto produjo un tinte café oscuro e insoluble con las esterasas.

La mezcla se mantuvo en agitación constante por 20 minutos para desarrollar la tinción apropiada.

Se detiene la reacción al colocar el gel dentro de una bandeja que contiene 300 ml de solución de desteñido de proteínas.

RESULTADOS Y DISCUSION

La Fig 2 presenta un gel que contiene la muestra de diez clones de papa. Este gel presenta ocho migraciones proteínicas, más la del patrón clon U.A. 1388.

El clon patrón, de acuerdo a la clave de Stegemann y Loescheke (14), presenta cuatro bandas principales de proteínas en el sector catódico; estas bandas corresponden a la A; B; C y D. Tales bandas principales, que pueden estar presentes en su totalidad o en parte, sirven para reunir en distintos grupos a materiales que tengan similitud de dichas bandas. De esta manera, el clon U.A. 1388 pertenece al grupo 8, por poseer las cuatro bandas principales.

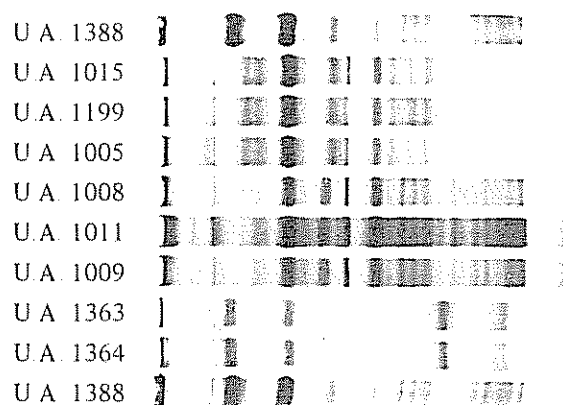


Fig 2. Gel de proteínas que contiene 10 migraciones proteínicas en clones de papas. Las ocho interiores corresponden a los clones en estudio, mientras que las dos exteriores corresponden a un mismo clon, el U.A. 1388 que se utilizó como patrón de referencia.

Los clones U.A. 1015, U.A. 1119 y U.A. 1005 presentan, en comparación con el testigo de referencia (U.A. 1388), las bandas B, C y D, correspondiendo al grupo cuatro. Los números U.A. 1008; U.A. 1011 y U.A. 1009 presentan, al igual que el grupo anterior, las mismas bandas B, C y D. Sin embargo, al observar hacia el ánodo, aparece una serie de bandas delgadas que presentan estos últimos tres números y que no posee el grupo anterior. De esta forma, se van identificando clones que presentan bandas en igual número e intensidad. Los números U.A. 1363 y U.A. 1364 presentan las bandas A y B correspondiendo al grupo 6. De acuerdo a la observación de bandas hacia el ánodo, estos números parecieron ser idénticos.

La intensidad de bandas proteínicas pueden variar, como lo indican Stegemann *et al* (13), de acuerdo a la madurez del tubérculo y a la brotación; además, su nitidez es relativa. Por ello, el estudio de las bandas finas del ánodo debe hacerse usando las esterasas.

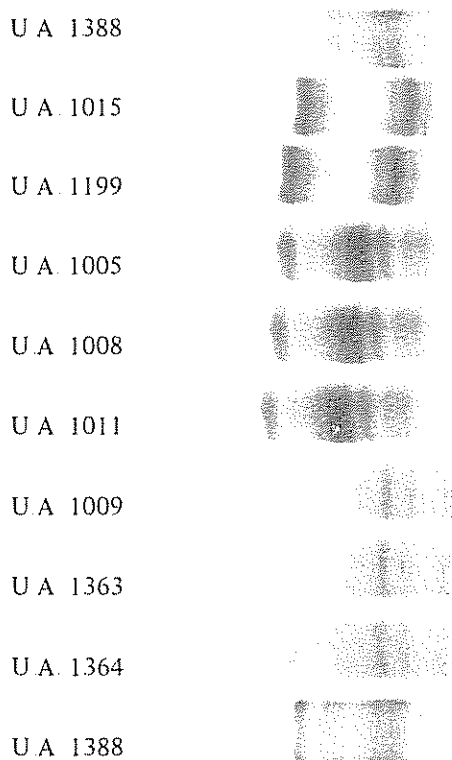


Fig. 3. Gel que contiene 10 migraciones de estererasas en clones de papas utilizados para proteínas (Fig. 2)

El gel de estererasas, indicado en la Fig. 3 ratifica, en forma taxativa, la diferencia de los grupos que presentan las bandas B, C y D. De esta forma, se pueden ordenar estos números como aparece en el Cuadro 2.

Así, de nueve clones analizados por este método, se han reducido a cuatro clones, ya que existe sinonimia entre los ya analizados.

CONCLUSIONES

— La metodología utilizada es sencilla, rápida y de fácil resolución para hacer estudios de espectroforegramas en papa.

— El espectro proteínico determina la agrupación general de los materiales en estudio, de acuerdo a sus cuatro bandas principales.

— El efecto de las estererasas ratifica las sinonimias presentes en los materiales en estudio.

— Esta técnica presenta una gran ayuda porque permite hacer una rápida y certera diferenciación entre clones de papa, lo cual es importante en el mantenimiento de bancos de genes y en la elaboración de un catálogo de inscripción de variedades.

LITERATURA CITADA

1. ARUTA, C. 1983. Untersuchungen zur elektrophoretischen und biologischen Differenzierung von Stämmen des potato virus Y Smith. Diss. Dr. Rer. Hort. Hannover, Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, Universität Hannover. 78 p.
2. CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA. 1977. Colección y clasificación de *Solanum*. Informe Anual CIP p. 17-20.
3. CONTRERAS, A.; ARUTA, C.; BANSE, J.; FUENTE-ALBA, J.; ASENJO, F.; MANQUIAN, N. 1980. Germoplasma chileno de papas (*Solanum* sp.). Valdivia, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 43 p. (Serie A 4).
4. DESBOROUGH, S.; PELOQUIN, S.J. 1968. Potato variety identification by use of electrophoretic patterns of tuber proteins and enzymes. *American Potato Journal* 45:220-229.
5. GONZALEZ, F. 1984. Catálogo de electroforegramas de los principales cultivares de trigo nacionales (*Triticum* spp.). Tesis Lic. Agr. Valdivia, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 50 p.
6. MARTINEZ, F. 1983. Identificación de clones de papas chilena (*Solanum tuberosum* L.) por determinación de patrones electroforéticos. Tesis Lic. Agr. Valdivia, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 50 p.
7. Mc-NAIR, N.; ESQUIVEL, B. 1973. Cromatografía líquida de alta presión. Washington, D.C., Organización de los Estados Americanos. 58 p. (Monografía no. 10).
8. MORRIS, J.; WRIGHT, N. 1975. Detection on polyacrylamide gel of a diagnostic nucleic acid from tissue infected with potato spindle tuber viroid. *American Potato Journal* 52:57-63.
9. NERENBERG, S.I. 1968. Electroforesis; manual práctico de laboratorio. Barcelona, Ed. Jims. 245 p.
10. STEGEMANN, H. 1975. Potato protein. In: The chemistry and biochemistry of plant protein. Ed. by Harborne, J.; Van Sumere, C. London. p. 72-76.

11. STEGEMANN H. 1982. Electroforesis y electroenfoque en placas Page-manual Biologische Bundesanstalt für Land-und Forstwirtschaft Braunschweig Berlin, Institut für Biochemie 19 p
12. STEGEMANN, H. 1985. Index 1985 Europäischer Kartoffelsorten Berlin, Paul Parey. 128 p
13. STEGEMANN, H.; FRANCKEN, H.; MACKO, V. 1973. Genetic and physiological changes evaluated by one and two dimensional PAA-GEL-techniques Zeit. Natur 28:722-732
14. STEGEMANN, H.; LOESCHCKL, V. 1976. Index Europäischer Kartoffelsorten; Bestimmung durch elektrophoretische Spektren Berlin, Paul Parey 214 p
15. STEGEMANN, H.; SCHNICK, D. 1982. Index 1982 Europäischer Kartoffelsorten, Zulassungslisten, Bonitierung, genetische Daten. Berlin, Paul Parey. 219 p.
16. UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE. FACULTAD DE CIENCIAS 1974. Electroforesis; técnicas actualizadas y sus aplicaciones. 74 p
17. ZACHARIUS, R.M., KRULICK, S.; PORTER, W.L. 1971. Concerning the constancy of the protein electrophoretic pattern of potato variety. American Potato Journal 48:57-63

Notas y Comentarios

El retorno de la mariposa azul de Inglaterra

La mariposa "Large Blue of England", que había desaparecido por ser la preferida de los coleccionistas de mariposas bellas, está ahora siendo ayudada a ocupar su antiguo habitat, después de haber estudiado minuciosamente su vida y costumbres. Conocida como *Licena arion*, su estilo de vida era hasta hace poco un enigma. Se sabía que dependía de algún modo de las hormigas y que se alimentaba de una planta aromática, probablemente del género *Thymus*, relacionada con los tomillos, plantas de la familia de las labiadas, usadas en Europa como condimentos. Es conocido por los botánicos que son raras las plantas labiadas no aromáticas.

Tomó al Dr. Jeremy Thomas, del **Institute of Terrestrial Ecology**, en Furzenbrook, Dorset, mucha investigación para descifrar el resto del enigma. Las hembras de las mariposas ponen sus huevos en las yemas florales del tomillo que crece en las praderas inglesas de suelo calizo. Las orugas que emergen se alimentan de las flores y se vuelven de un color rosado igual al de las yemas. Después de la muda final, caen al suelo al anochecer.

Aquí es donde aparecen las hormigas. Después de secretar un líquido lechoso para estimular a las hormigas, la oruga es llevada por la hormiga afectada a su nido. Colocada así bajo tierra, la oruga se alimenta de huevos y gusanos de la hormiga por diez meses, y finalmente emerge del nido como una adulta mariposa, la "Large Blue". El problema es que no es suficiente cualquier hormiga roja. Las orugas de la mariposa azul

sólo prosperan en nidos de *Myrmica sabuleti* en los que hay bastantes larvas como para que sobreviva una colonia de mariposas azules.

Más o menos la mitad de las praderas británicas en las que se criaba la Azul Grande han sido destruidas en la actualidad, muchas veces por el arado o por la siembra de árboles forestales. La otra mitad generalmente tenía todavía bastantes tomillos, pero casi nada de *Myrmica sabuleti*. Esta hormiga es muy exigente en sus necesidades. Prospera sólo en pequeñas praderas, bien pastoreadas, en laderas soleadas. Lo que hizo desaparecer a la hormiga y por consiguiente a la Azul Grande, fue el matorral que invadió esas praderas. La mixomatosis había matado a los conejos y a su meticuloso ramoneo que mantenía en forma las pequeñas praderas y en consecuencia, los agricultores pusieron sus ovejas a pastar en tierras mejores.

Cuando se comprendió bien el papel de la hormiga roja y su preferencia por los pastos bien cortos, ya había muerto la última Azul Grande británica (en 1979). Extinguida en los Países Bajos en 1950, tiene también una tenue existencia en buena parte de la Europa Occidental. La Azul Grande no fue la primera mariposa que dio su último aleteo en suelo británico... y sin duda habrán otras más.

Ahora, se está operando lo que puede ser un retorno triunfal de varias especies. Una combinación de investigación por el Instituto de Ecología Terrestre, el que descubrió los secretos de la Azul Grande, con reservas naturales suministradas por el **Nature Conservation Council** y subsidios obtenidos del **World Wildlife**

Fund se han combinado para reintroducirla en un par de sus antiguas querencias en el sudeste de Inglaterra.

Basándose en anteriores ensayos hechos con Azules Grandes provenientes de Suecia, el principal lugar de liberación en Inglaterra (la ubicación del cual es un secreto celosamente guardado), importó unas 200 mariposas adultas en el verano pasado. Estas pusieron unos 4 500 huevos. El tomillo silvestre se está incrementando en el lugar y como resultado de un pastoreo más intenso, la grama tiene ahora muchas más hormigas rojas hospedantes que cuando la Azul Grande volaba sobre ella en el pasado. Una segunda colonia secreta fue iniciada en 1988. Para conservar una especie amenazada parece conveniente conocer tanto a sus amigos como a sus enemigos.

Ratones que tienen dos genes de masculinidad

Los ratones pueden tener más de una copia de gen responsable para el desarrollo de los machos. Los científicos han identificado recientemente un gen, llamado **ZFY**, en el cromosoma Y de los humanos que, ellos creen, determina la masculinidad. La mayoría de los mamíferos placentados tienen un gen en el cromosoma Y que es estructuralmente similar al humano. Dos grupos de investigadores informan ahora que los ratones, a diferencia de otros mamíferos, tienen por lo menos dos de estos genes.

Graeme Mardon, en el Massachusetts Institute of Technology, en Cambridge, MA., y sus colegas, usaron una copia del gen humano como medio de exploración para investigar los genes que determinan la masculinidad (el desarrollo de los testículos), en los ratones (*Science*, v. 243, p. 78). Si las secuencias del DNA en los ratones fueran similares a aquellas del DNA en el **ZFY**, entonces, los dos segmentos serían equivalentes. Los investigadores encontraron una coincidencia en dos partes del cromosoma Y, tomadas de dos especies diferentes de ratón. Llamaron entonces a los genes **Zfy-1** y **Zfy-2**, por analogía con el gen humano.

Mardon y sus colegas creen que solamente el gen **Zfy-1** es necesario para determinar los testículos. Los investigadores usaron exploraciones de DNA para investigar los genes en ratones que tienen mutaciones en la parte del cromosoma Y que determina el sexo. Todos estos ratones tenían **Zfy-1**, pero, a algunos les faltaba el **Zfy-2**. Si el **Zfy-2** estaba ausente, el ratón siempre desarrollaba testículos.

Los avances en los estudios sobre la biología de las asociaciones entre plantas e insectos están permitiendo determinar que esta simbiosis ocurre en otras especies y su funcionamiento es similar. Hace poco escribimos sobre el caso de las orugas de **Memoria arizonaria** que imitaban las yemas florales y ramitas del roble del cual se alimentaban, el cual fue estudiado en detalle por Eric Greene, de la Universidad de Princeton, en New Jersey (*Science*, v. 243, p. 643). Al parecer, estos gusanos disfrazados no son casos únicos y se presentan en más de un lugar del planeta. No vacilamos en afirmar que esperamos que estos casos seguirán apareciendo, conforme los científicos estudien más ejemplos de simulaciones beneficiosas entre los reinos vegetal y animal. AG.

Claude Nagamine, en la University of California, en San Francisco, y sus colegas, también realizaron exploraciones con DNA para investigar si los ratones tenían genes que se parecieran al **ZFY** humano (*Science*, v. 243, p. 80). Usando una exploración con DNA de ratón similar a las exploraciones hechas a partir del gen determinante de testículos en los humanos, también encontraron dos zonas del cromosoma Y que igualaban la exploración. Al igual que el grupo Mardon, este equipo encontró que sólo uno de los dos genes era necesario para el desarrollo de testículos en un embrión.

El **Zfy-2** no es necesario para el desarrollo de los testículos, de tal manera que ¿para qué sirve? Nagamine y sus colegas encontraron que el **Zfy-2** era activo en los testículos de los ratones adultos. Los investigadores especulan que el **Zfy-2** puede estar involucrado en la manera de cómo funcionan los testículos. Encontraron también otras dos zonas de DNA que coincidían con la exploración: una estaba en el cromosoma X y el otro no estaba en ninguno de los cromosomas del sexo. Sugieren que las secuencias de DNA involucradas en determinar los testículos en los ratones han sido duplicadas en su evolución.

Los que no poseemos la minuciosidad del investigador que va paso a paso avanzando en su exploración, no podemos menos que pensar en mujeres hombrunas que tienen genes con X en sus cromosomas Y, en hombres rijosos que tienen más de un gen X, o afeiminados que tienen más genes Y que los necesarios. AG.

Charcoal Rot Screening Procedure and Virulence of *Macrophomina phaseolina* Isolates on Dry Edible Beans¹ *

G S. Abawi**, M A Pastor-Corrales***

ABSTRACT

In greenhouse tests, dried sclerotia of *Macrophomina phaseolina* were the most effective form of inoculum to initiate a high and consistent incidence of charcoal rot needed to determine the reaction of bean accessions and the virulence of pathogen isolates. Sclerotia were produced in a liquid medium containing 10 g peptone, 15 g dextrose, 0.25 g MgSO₄ · 7H₂O and 0.5 g K₂HPO₄ in one liter of water. After a minimum of two weeks incubation at 30°C, mycelial mats with abundant sclerotia were homogenized in a mixer with distilled water, centrifuged, washed once and then dried for 48 hrs. Dried sclerotia were mixed into pasteurized soil at a rate of 2 g/kg soil. Inoculation consisted of covering bean seeds planted in pots or flats with 2-3 cm layer of the soil infested with *M. phaseolina*. Seedlings of susceptible materials such as A 70 and A 464 failed to emerge and/or exhibited severe disease symptoms and died within two weeks after planting. In contrast, seedlings of resistant accessions such as San Cristobal 83, BAT 477, BAT 332 and G 5059 (H6 Mulatinho) exhibited slight or no disease symptoms. Isolates of *M. phaseolina* obtained from bean tissues collected from Brazil, Colombia, and Peru differed significantly in their virulence to bean cultivars susceptible to *M. phaseolina*. For example, plants of A 70 inoculated with *M. phaseolina* isolates Nos. 35 and 103, had a disease severity (1-9 scale) of 9.0 and 1.6, respectively.

INTRODUCTION

M*acrophomina phaseolina* (Tassi) Goid is the causal agent of charcoal rot (Ashy stem blight) of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) (8, 10, 13, 17). The disease is prevalent in warmer bean-growing areas, especially those with drought periods which occur in the north-east region of Brazil, and certain

¹ Received for publication 18 February 1988

We thank Lucia Afanador, Carlos Jara, Guillermo Castellanos and their assistants for technical help; and Leonora Duque for typing the manuscript. Special thanks are due to Drs A. van Schoonhoven and Jeff White for their critical review of this manuscript.

* This study was supported by and conducted at the Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) where the senior author was on sabbatical leave in 1985-1986

** Professor, Department of Plant Pathology, N.Y.S. Agri. Exp. Station, Cornell University, Geneva, NY 14456

*** Plant Pathologist, Bean Program, CIAT, Cali, Colombia

COMPENDIO

En prueba de invernadero se encontró que esclerocios secos de *M. phaseolina* son la forma de inóculo más efectivo para iniciar pudrición carbonosa (charcoal rot) con una incidencia alta y consistente. Este tipo de incidencia es necesaria para determinar la reacción de líneas de frijol y la virulencia de aislamientos del patógeno. Los esclerocios fueron producidos en medio líquido que contenía 10 g de peptona, 15 g de dextrosa, 0.25 g MgSO₄ · 7H₂O y 0.5 g K₂HPO₄ por litro de agua. Después de un mínimo de dos semanas de incubación a 30°C, nudos de micelio con abundantes esclerocios fueron homogenizados en una mezcladora con agua destilada, centrifugados, lavados una vez y secados por 48 horas. Esclerocios secos fueron mezclados con suelo pasteurizado en una proporción de 2 g/kg de suelo. Para la inoculación, las semillas de frijol fueron sembradas en materas o bandejas y cubiertas con una capa de 2 a 3 cm de suelo infestado con *M. phaseolina*. Las plántulas de líneas susceptibles, tales como A 70 y A 464, no emergieron y/o exhibieron severos síntomas de enfermedad y murieron después de dos semanas de sembradas. Por el contrario, semillas de material resistente como San Cristóbal 83, BAT 477, BAT 332 y G 5059 (H6 Mulatinho) presentaron ligeros o ningún síntoma de enfermedad. Aislamientos de *M. phaseolina* obtenidos de tejidos de frijol colectados en Brasil, Colombia, y Perú difirieron significativamente en su virulencia a variedades de frijol susceptibles a *M. phaseolina*. Por ejemplo, plantas de A 70 inoculadas con los aislamientos 35 y 103 tuvieron una severidad de enfermedad de 9.0 y 1.6, respectivamente (evaluadas con la escala DSR, 1-9).

regions in Colombia, Mexico, Peru, Venezuela and Kenya. The pathogen is worldwide in distribution and has a wide host range, causing charcoal rot diseases on more than 500 plant species including soybean, maize, sorghum, cotton and edible legumes (7). Variation in morphology and virulence among isolates of *M. phaseolina* has been reported on soybeans, sesame and other crops (5, 6, 11). The fungus survives in soil as sclerotia embedded in organic debris or free in soil (3, 5, 15).

Data on yield reduction and economic losses resulting from infection of dry edible beans by *M. phaseolina* are limited. However, epidemic outbreaks and yield losses due to charcoal rot of bean have been recently observed in many bean-growing areas in Latin America where drought stress has prevailed during part of the growing season. Depending on the severity and time of initial infection, damage to beans by *M. phaseolina* may be in the form of reduced

emergence, postemergence damping-off, reduced vigor, progressive wilting, defoliation and premature dying. The Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) has emphasized the identification and development of resistant bean germplasm as a relatively low input and lasting management practice for small farmers, who produce the majority of beans in Latin America. However, only limited information is available on screening methodologies and the reaction of dry edible bean germplasm to *M. phaseolina*. Thus, the objectives of this study were to develop a rapid, accurate and simple screening method for evaluating the reaction of bean accessions to *M. phaseolina*, and to determine the extent of variability in virulence among isolates of *M. phaseolina* to beans. A brief summary of this investigation has been published previously (1).

MATERIALS AND METHODS

All isolates of *M. phaseolina* used in this study were obtained from infected bean tissues. Isolates 1, 2, 33, 34, 37, 38, and 40 were collected in Colombia; 101, 102 and 103 from Peru and 35 and 36 from Brazil. Infected bean tissues were washed in running tap water, surface sterilized for 2 min in 1% NaOCl solution, and then plated onto acidified potato-dextrose agar (APDA) at 30°C. Isolates were maintained by periodic hyphal tip transfers onto APDA or were stored under mineral oil in screw-capped glass test tubes.

Initially, several inoculum sources of *M. phaseolina* such as sclerotia, colonized whole rice seeds and mycelial agar disks were compared for their efficiency in inducing charcoal rot on the snapbean cultivar 'Bush Blue Lake 47' and the dry bean cultivar 'California Light Red Kidney'. Sclerotial inoculum was produced on the soybean-seed extract broth (SSEB) (9), Difco potato-dextrose broth (PDB), and a synthetic liquid medium (SLM) consisting of 10 g peptone, 15 g dextrose, 0.25 g MgSO₄ 7H₂O, and 0.5 g K₂HPO₄/l water. After 15 days incubation at 30°C, the mycelial-sclerotial mat was blended in a Vertis mixer with distilled water, centrifuged at 5 000 g, the pellet resuspended in distilled water and recentrifuged. Washed pellets were spread on filter papers and allowed to dry aseptically for 48 h at 30°C. The dried sclerotial masses were ground in a mortar and the preparation mixed into pasteurized soil (30 min at 60°C) at different rates (0.5-4.0 g/kg soil) for inoculation tests. The highest number of sclerotia was produced on SLM, which was used exclusively in subsequent tests unless otherwise stated. One gram of the sclerotial preparation produced approximately 6 x 10⁵ growth forming units on APDA plates.

The rice inoculum was prepared by first autoclaving moistened whole rice seeds (1:1 g rice seeds: ml water). After cooling, the rice seeds received 7-day-old mycelial agar disks of *M. phaseolina* and the mixture was incubated at 30°C for 15 days. The mycelial agar disk preparation consisted of 6 mm diameter disks obtained from the margin of 7-day-old colonies of *M. phaseolina* on APDA.

Inoculation procedures consisted of i) placing a 2-3 cm layer of the sclerotial inoculum (approximately 150 ml/10 cm diameter pot); ii) placing one to three *M. phaseolina* colonized whole rice seeds; or iii) placing 6 mm diameter mycelial potato-dextrose agar (PDA) disks (one to three) of *M. phaseolina* on top of seeds or around lower stems of 7 to 10 day-old seedlings. All plants were maintained in a greenhouse at Cali, Colombia (about 1000 m above sea level) with a temperature fluctuating between 20°-33°C and relative humidity of 35-80%. Plants were watered daily as needed, and fertilized once a week with 50 ml solution/10 cm diameter pot of a complete fertilizer (15-15-15, NPK: 3 g/l).

Disease severity ratings (DSR) were recorded at weekly intervals using the CIAT adapted scale of 1-9 (4). For above-ground evaluations, a DSR of one refers to no visible symptoms, whereas a DSR of nine indicates that all stem tissue and the growing point are often affected, resulting in a dead plant. Ratings of three, five and seven refer to lesions that are limited to cotyledonary tissue, lesions that have progressed from cotyledons to approximately 2 cm of stem tissue, and to extensive lesions covering stem tissue and resulting in chlorosis and necrosis of the foliage, respectively. For below-ground evaluation, DSR of one indicates no visible symptoms and DSR of nine refers to 50% or more of lower stem tissue covered with lesions and the associated production of numerous fruiting structures. Ratings of three, five and seven for stem infections refer to approximately 1, 10 and 25% of lower stem tissue covered with lesions of *M. phaseolina*.

The virulence to beans of several *M. phaseolina* isolates obtained from different growing areas in Brazil, Colombia and Peru were compared on susceptible (A 70) and resistant (BAT 477) breeding bean lines from CIAT. Sclerotia of all isolates were produced on each SLM and mixed into pasteurized soil at a rate of 2 g/kg soil. Seeds of each bean line were inoculated, maintained for three weeks in the greenhouse, and evaluated following the procedures described above.

All tests were conducted in randomized block designs, replicated at least four times. Unless other-

wise indicated, each experimental unit (replicate) consisted of four seeds or four seedlings per 10 cm diameter pot. Data from each test were subjected to analysis of variance and LSDs were calculated if *t*-tests indicated statistical significance.

RESULTS

Efficiency of inocula and method of inoculation

Since sclerotia are the primary surviving structure of *M. phaseolina*, the initial test compared different densities of sclerotia (0.1, 0.5, 1.0 and 2.0 g dry sclerotia/kg soil) in pasteurized soil placed around the stems of ten-day-old seedlings. Charcoal rot severity ratings generally increased as sclerotial density increased from 0.1 to 2.0 g/kg soil (Table 1). Also, disease severity was higher on the snap bean cultivar 'Bush Blue Lake 47' than on the dry bean cultivar 'California Light Red Kidney'. In addition, sclerotia produced on the SSEB induced greater charcoal rot severity than a comparable density of sclerotia produced on PDB. The analysis of variance showed signi-

ficant effects ($P = 0.05$) due to cultivar growth medium used for sclerotial production, and sclerotial density. Nevertheless, disease severity ratings from lower stem tissue were low with no apparent effect on plant growth even at the highest sclerotial density of 2 g/kg soil. However, a greater charcoal rot severity developed when bean seeds, as compared to seedlings, were inoculated with infested soil samples. All further tests therefore were conducted by inoculating seeds at planting time.

Charcoal rot severity was high when bean seeds were inoculated with sclerotial inoculum (2 g dry sclerotia/kg soil), colonized rice seed or a 6 mm mycelial agar disk of *M. phaseolina* at planting time (Table 2). Below-ground charcoal rot severity ratings of the same plants were comparable to those recorded on foliar parts with a modified scale. Disease severity ratings for the sclerotial, colonized rice seeds and mycelial agar disks of *M. phaseolina* isolate No. 34 were 7.6, 8.7 and 7.4, respectively. Dry weight of inoculated plants was significantly lower than noninoculated plants.

There were significant differences in the virulence of the three isolates of *M. phaseolina* used, with isolates 34 and one as the most and least virulent to beans respectively.

The effect of different soil densities of sclerotia on charcoal rot incidence and severity was evaluated on California Light Red Kidney. Analysis of variance showed a significant linear effect of sclerotial inoculum on charcoal rot severity and reduction of dry weight (Table 3). Again, differences were evident for isolate virulence to beans. Charcoal rot severity ratings from lower stem tissues of the same plants were remarkably similar and proportional to foliar ratings as reported in Table 2. For example, DSR of lower stem tissues for the 0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 g sclerotia/kg soil for isolate 34 were 5.5, 6.4, 7.6 and 8.4, respectively. The virulence to beans of the four isolates of *M. phaseolina*, used in descending order, were isolate Nos. 34, 33, 1 and 2. Results of this test and others, have shown that the 2 g dry sclerotia/kg soil consistently incited a severe incidence of charcoal rot with considerable reduction of plant growth, and thus it was used in all future tests.

The effectiveness of sclerotial and colonized whole rice seed inocula to incite charcoal rot was further evaluated on susceptible (A 464) and resistant (BAT 477) bean lines (3, 16). Sclerotia of *M. phaseolina* isolate No. 34 were produced on SSEB or SLM and were used to infest soil at the 2 g/kg soil rate, or two rice seeds colonized by *M. phaseolina* were placed next to each bean seed prior to covering seeds

Table 1. Effect of growth medium and sclerotial density of *Macrophomina phaseolina* (isolate No. 33) on charcoal rot severity. Ten-day-old seedlings of Bush Blue Lake 47 (BBL 47) and California Light Red Kidney (CLRK) were inoculated with 150 ml of pasteurized soil infested with sclerotia of *M. phaseolina* placed around the lower stem tissue.

Media and cultivar	DSR (1-9) ^a sclerotial density (g/kg soil)				Mean
	0.1	0.5	1.0	2.0	
PDB^b:					
BBL 47	1.3 ^d	2.8	3.1	3.5	2.7
CLRK	1.1	2.1	2.0	2.6	2.0
SSEB^c:					
BBL 47	2.0	2.6	3.4	3.6	2.9
CLRK	1.3	2.7	3.0	3.3	2.6

ANOVA revealed significant effects due to cultivar, medium, and inoculum density, $LSD_{0.5} = 0.9$

a) Disease severity ratings (DSR) were recorded three weeks after inoculation using a scale of one (no visible symptoms) to nine (50% or more of stem tissue covered with lesions).

b and c) Refers to potato-dextrose broth and soybean-seed extract broth produced sclerotia of *M. phaseolina*, respectively.

d) Each number is an average of five replicates (4 plants/replicate). Noninoculated controls remained free of disease (DSR = 1.0).

Table 2. Effect of three inocula sources on charcoal rot severity and plant growth in California Light Red Kidney exposed to three Colombian isolates of *Macrophomina phaseolina* (Mp).

Isolate code	DSR (1-9) ^a and dry wt., (g) ⁹ /inoculum source ^c					
	Sclerotia		Colonized seeds		Mycelial Agar disks	
	DSR	Dry wt	DSR	Dry wt	DSR	Dry wt
None (check)	1.0 ^d	2.9				
Mp 1	3.6	2.1	4.8	2.0	2.7	2.2
Mp 33	6.7	1.1	5.0	1.9	5.7	1.7
Mp 34	7.4	0.6	8.5	0.1	7.3	0.7
LSD _{0.5}	DSR = 1.16			Dry weeks = 0.42		

- a) Disease severity ratings (DSR) were recorded three weeks after inoculation using a scale of one (no visible symptoms) to nine (all stem tissues and the growing point are affected – dead plant)
- b) Plants were dried at 95°C for 48 h
- c) About 150 ml of pasteurized soil infested with sclerotia of *M. phaseolina* (2 g dry sclerotia/kg soil) were placed on top of bean seeds; one colonized rice seed, or one 6 mm mycelial agar disk from the margin of a five-day-old colony of *M. phaseolina*, was placed on top of each bean seed
- d) Each number is an average of five replicates. Data for noninoculated checks were not included in the ANOVA.

(4/10 cm diameter pot) with 150 ml of pasteurized soil. Seeds were inoculated with the sclerotia inoculum by covering them with 150 ml of infested soil. All inocula differentiated the reaction of the two bean lines by one-two weeks after inoculation (Table 4). Sclerotial inoculum most consistently produced significantly greater disease severity, especially when sclerotia were produced on SLM. Analysis of variance revealed highly significant effects for inocula, cultivar and inocula x cultivar interactions. Based on these results others, it was concluded that the screening technique involving the use of sclerotia of *M. phaseolina* produced on SLM at a rate of 2 g/kg soil was the most appropriate for evaluating the reaction of dry edible bean germplasm to infection by *M. phaseolina* under greenhouse conditions (Fig. 11).

Virulence of *M. phaseolina* isolates to beans. Isolate No. 34 of *M. phaseolina*, the most virulent isolate used to evaluate inocula form and inoculation methodologies (Tables 2, 3), was compared to nine other isolates of *M. phaseolina* obtained from infected bean tissue collected in Colombia, Peru and Brazil. Sclerotia of all isolates were produced on SLM and incorporated into pasteurized soil at 2 g/kg soil. The ten isolates of *M. phaseolina* varied significantly in their virulence on the susceptible bean breeding line A 70 when evaluated one, two or three weeks after inoculations (Table 5, Fig. 1L). However, only slight disease symptoms restricted to cotyledonary tissue were observed on the resistant breeding line BAT 477. Isolate No. 39 induced the highest disease severity ratings (a score of 2.2) on BAT 477. Bean

germplasm with disease severity ratings of three or less are considered resistant (4).

Symptomatology. Seeds of highly susceptible bean germplasm such as A 70 and A 464 may become severely infected shortly after inoculation resulting in poor emergence and seedling establishment. The first observed symptoms on emerging seedlings of susceptible germplasm were dark, irregular lesions of different sizes on the cotyledons (Fig. 1 E). These lesions expanded rapidly in susceptible cultivars covering the whole cotyledonary tissues and progressed through the base of cotyledons into stem tissue (Fig. 1 H, K). Infected cotyledons always remained attached to stems, probably as a result of extensive hyphal growth of the fungus. A characteristic blight and systemic chlorosis appeared on young leaves of infected plants even when lesions were only small and arrested (Fig. 1 F, H, L). The systemic chlorosis can be confined to one side of the plant or even restricted to one-half of a leaf. The dark, sunken lesions continued to expand upward and downward in stem tissues (Fig. 1 F, K). The expanding lesions eventually reached the growing points, resulting in plant death, or the lesions weakened and broke the stem (Fig. 1 F, K, I). Similar symptoms and progression of disease on young seedlings also occurred under field conditions (Fig. 1 D). Occasionally, leaf tissues also were found infected and often appeared to occur in association with the veins of leaf tissues (Fig. 1 G). Diagnostic dark, sunken lesions also occurred on the lower stem tissues (Fig. 1 J). These lesions were initially longitudinal and narrow, but expanded and eventually

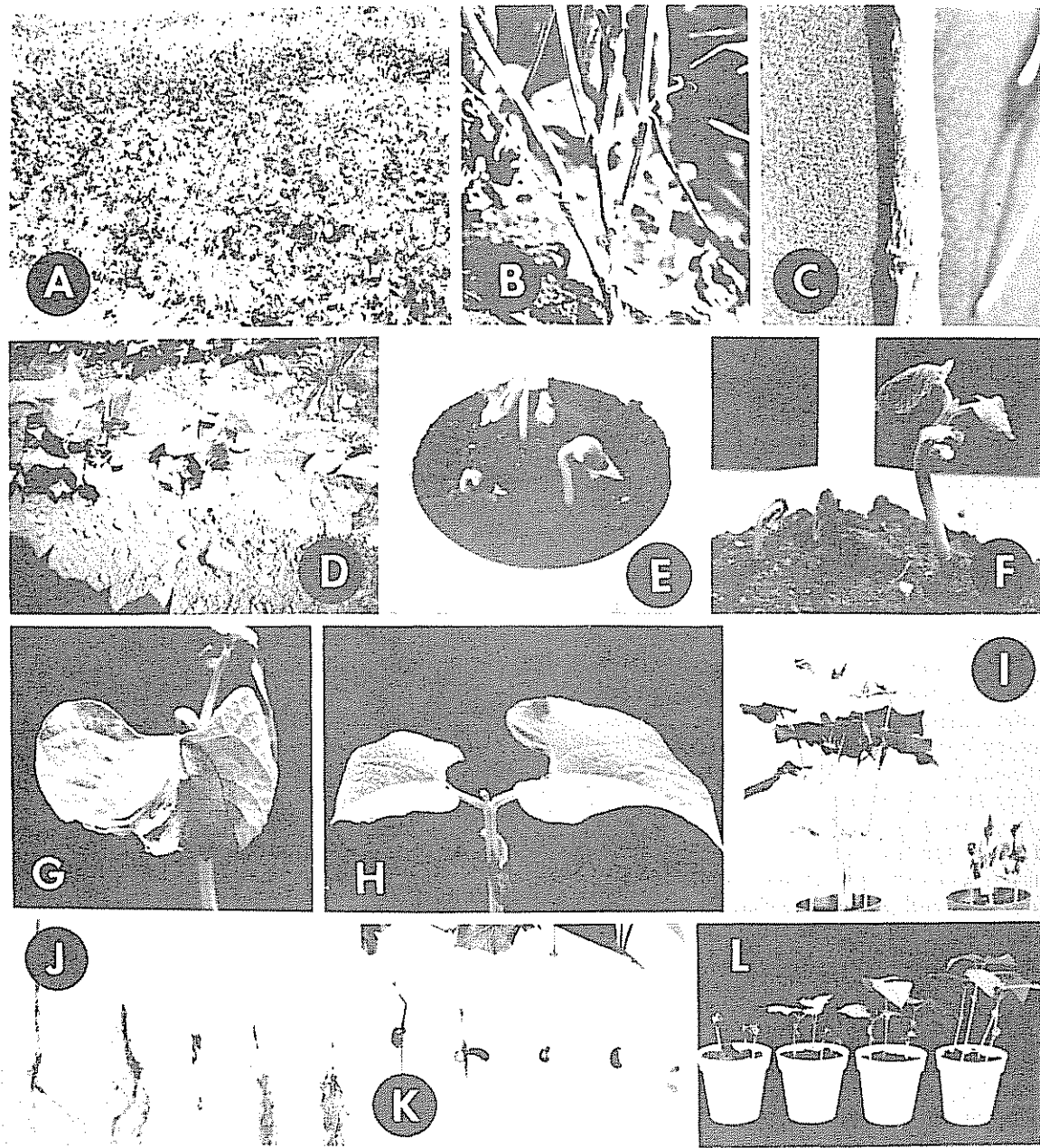


Fig. 1 Symptomatology and host-parasite relationship of *Macrophomina phaseolina* to beans A) Severely infected area in a field exhibiting wilting, chlorosis and necrosis on older plants B) Close up of an infected plant showing large infected areas on stem and branches with the characteristic ashy color C) Close up of an infected stem area with the diagnostic sclerotial production on and in the ashy colored tissue D) Infected young plants in the field E) Seedlings exhibiting lesions on cotyledons shortly after emergence F) Young seedling severely infected with *M. phaseolina* resulting in death of two out of the three seedlings G) Leaf tissues infected with *M. phaseolina*. H) Infection from the cotyledon is progressing into stem tissue with systemic chlorosis of the leaf on the left I) Seedlings of resistant BAT 477 (left) and susceptible A 70 (right) inoculated with sclerotial inoculum of *M. phaseolina* J) Lesions of *M. phaseolina* on lower stem tissue K) Different stages of the progress of charcoal rot lesions from the cotyledons into stem tissue L) Seedlings of A 70 inoculated with *M. phaseolina* isolate number (left to right) 35, 36, 102, and 103

Table 3. Virulence of four Colombian isolates of *Macrophomina phaseolina* at four sclerotial densities on California Light Red Kidney beans.

Isolate code ^d	DSR (1-9) ^a and dry wt, (g) ^b /sclerotial density (g/kg soil) ^c							
	0.5		1.0		2.0		4.0	
	DSR	Dry wt	DSR	Dry wt	DSR	Dry wt	DSR	Dry wt
-(Check)	1.0 ^e	2.9						
Mp 1	2.7	2.3	2.5	2.1	3.6	2.1	6.9	1.1
Mp 2	1.2	2.6	1.3	2.6	2.2	2.5	1.4	2.7
Mp 33	5.9	1.5	6.9	1.0	6.7	1.1	6.9	0.8
Mp 34	6.3	1.5	6.3	1.2	7.4	0.6	8.5	0.2
LSD _{0.5}	DSR = 1.75				Dry wt = 0.69			

ANOVA revealed a significant linear effect of sclerotial inoculum density

- Disease severity ratings (DSR) were recorded three weeks after inoculation using a scale of one (no visible symptoms) to nine (all stem tissues and the growing point are affected – dead plant)
- Plants were dried at 95°C for 48 h
- About 150 ml of pasteurized soil infested with sclerotia of *M. phaseolina* (0.5–4.0 g dry sclerotia/kg soil) were placed on top of bean seeds.
- Each number is an average of five replicates. The data for noninoculated checks were not included in the ANOVA

covered the entire stem. Expansion of these lesions was rather slow and rarely proceeded above the soil surface under greenhouse conditions. However, such expansion may occur under field conditions and may well be increased by water stress (Fig. 1 A, B). Infected stem and petiole tissues became bleached in advance of fungal growth and such areas eventually became covered with sclerotia and/or pycnidia under field or greenhouse conditions (Fig. 1 C)

DISCUSSION

Sclerotia of *M. phaseolina* were the most efficient and consistent form of inoculum for inciting charcoal rot of beans. Sclerotia were produced most abundantly on the simple synthetic liquid medium described in this study. These sclerotia can be produced in advance and stored dry until use without problems of contamination or loss of infectivity. Colonized whole rice seeds also were an effective form of inoculum. After 15 days incubation at 30°C, rice seeds became completely covered by mycelial growth of *M. phaseolina* with abundant sclerotia formed on the seed surface. It is possible to produce large amounts of this inoculum in a short time, and with a minimum cost. Pastor-Corrales and Abawi (16) used colonized whole rice seeds (4 g/2 m row) for evaluating bean germplasm in replicated trials under field conditions. Mycelial agar disks of *M. phaseolina* are also an effective source of inoculum, but are cumbersome and

require considerable time to apply. Disease incidence was generally low and variable when naturally infected bean tissues were chopped into small pieces (1 cm long) or ground and used to inoculate bean seeds (unpublished data)

Inoculation of bean seeds in the greenhouse with pasteurized soil infested with 2 g sclerotia/kg soil accurately differentiated susceptible and resistant bean breeding lines and cultivars such as BAT 477, San Cristobal 83, A 70 and A 464 (3, 16). This method facilitated the screening of large numbers of bean accessions under controlled conditions (16). In addition, this inoculation procedure successfully documented the variability in virulence among *M. phaseolina* isolates to beans. It was interesting to find that although *M. phaseolina* isolates varied greatly in their virulence on the susceptible breeding bean line A 70, only minor differences occurred on the resistant line BAT 477 (Table 5). Thus, there is no basis from the results obtained in this study to suggest that physiological races exist among the population of *M. phaseolina* attacking beans. However, the evaluation of a larger group of isolates on a wider range of bean germplasm may reveal different results and is warranted. Khare *et al.* (12) reported that a soil isolate of *M. phaseolina* was more pathogenic to Urd bean (*Vigna mungo* (L.) Hepper), than isolates obtained from plant parts such as seeds, roots and foliage. Variability exists among *M. phaseolina* iso-

Table 4. Influence of inocula sources of *Macrophomina phaseolina* (isolate No. 34) on severity of charcoal rot development in the CIAT breeding lines BAT 477 (resistant) and A 464 (susceptible).

Inoculum source	Disease severity ratings (1-9) ^a			
	2 weeks		4 weeks	
	BAT 477	A 464	BAT 477	A 464
None (Check)	1.0 ^c	1.0	1.0	1.0
Sclerotia/SSEB ^b	2.4	6.5	2.4	7.5
Sclerotia/SLM ^c	2.5	9.0	2.6	9.0
Colonized seeds ^d	1.0	4.9	1.0	5.8
LSD _{0.5}	1.85		1.93	

ANOVA revealed highly significant effect of inocula, cultivar and inocula x cultivar interactions

a) Disease severity ratings two and four weeks after inoculation were recorded using a scale of one (no visible symptoms) to nine (all stem tissues and growing tip affected - dead plant)

b, c) Refers to the soybean-seed extract broth and the synthetic liquid medium, respectively, used for sclerotial production. Bean seeds were covered with the sclerotia infested soil inoculum (2 g/kg soil)

d) Three whole rice seeds colonized by *M. phaseolina* were placed in contact with each bean seed

e) Each number is an average of four replicates. Data of non-inoculated checks were not included in the ANOVA.

virulence (5, 6, 7, 11) Tompkins and Gardner (18) reported that strains (= isolates) of *M. phaseolina* obtained from sugar beet, cowpea, sweet potato, begonia, strawberry and cotton attacked beans at temperatures ranging from 20 to 40°C. They also reported that a strain from citrus and two others were not pathogenic to beans.

The high affinity of *M. phaseolina* to cotyledonary tissue under both greenhouse and field conditions as observed in this study is of significance and is well documented in the literature (5, 7). Lesions on cotyledonary tissue of susceptible bean germplasm enlarge rapidly and infect stem tissue in a few days, which eventually results in plant death. In contrast, cotyledonary tissue of resistant germplasm either escapes infection or established lesions expand slowly. Often, slightly infected cotyledons of resistant germplasm

Table 5. Virulence of ten isolates of *Macrophomina phaseolina* to susceptible (A 70) and resistant (BAT 477) bean germplasm, evaluated at one, two and three weeks after planting.

Isolate	Disease severity rating (1-9) ^a					
	BAT 477			A 70		
	1 wk	2	3	1 wk	2	3
Mp 34 ^b	1.0 ^e	1.2	1.2	3.9	8.0	8.4
Mp 37 ^b	1.1	1.3	1.6	2.8	4.6	4.6
Mp 38 ^b	1.3	1.4	1.5	4.0	7.7	8.1
Mp 39 ^b	1.3	2.2	2.0	4.3	8.2	8.7
Mp 40 ^b	1.0	1.4	1.2	2.3	7.3	8.3
Mp 101 ^c	1.0	1.2	1.2	2.7	5.2	6.3
Mp 102 ^c	1.0	1.1	1.2	2.0	3.3	3.9
Mp 103 ^c	1.0	1.1	1.0	1.2	1.4	1.6
Mp 35 ^d	1.2	1.0	1.6	5.2	9.0	9.0
Mp 36 ^d	1.2	1.5	1.5	4.1	8.0	8.2
None	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
LSD _{0.5}	1 = 0.81; 2 = 1.13; 3 = 1.13					

ANOVA revealed significantly different effects due to isolates, cultivar, and isolate x cultivar interactions.

a) Disease severity ratings were recorded one, two and three weeks after planting using a scale of one (no visible symptoms) to nine (all stem tissues and the growing point are affected - dead plant).

b, c, d) These isolates were obtained from infected bean tissues collected from Colombia, Peru and Brazil, respectively. Sclerotia of all isolates were produced on the synthetic liquid medium and mixed with pasteurized soil at a rate of 2 g/kg soil. Inoculations were made by placing 150 ml infested soil on bean seeds.

e) Each number is an average of four replicates. Data of the noninoculated checks were not included in the ANOVA.

fall off and this response may be an expression of the resistant mechanism.

Lesion incidence on lower stem tissue was proportional to the disease severity observed on the foliage. However, these lesions remained rather restricted as compared to the rapidly expanding lesions on the cotyledons and upper stem tissue. The maturity and physiology of different plant parts may be responsible for the observed differences in lesion expansion.

Nevertheless, restriction in the expansion of below-ground lesions from upward movement may be influenced by high soil moisture and relative humidity conditions which prevailed during the greenhouse tests. Incidence of *M. phaseolina* on older bean plants under field conditions has been considered to be most prevalent and damaging under high temperatures and drought stress (3, 7, 10, 14, 18).

LITERATURE CITED

- 1 ABAWI, G.S.; PASTOR-CORRALES, M.A. 1986. Screening procedure and virulence of isolates of *Macrophomina phaseolina* to beans. *Phytopathology* 76:1064.
- 2 CAMPBELL, C.L.; NELSON, L.A. 1986. Evaluation of an assay for quantifying populations of sclerotia of *Macrophomina phaseolina* from soil. *Plant Disease* 70:645-647.
- 3 CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. 1983. Bean Program Annual Report. Cali, Col., CIAT. 238 p.
- 4 CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. 1987. Standard system for the evaluation of bean germplasm. Cali, Col., CIAT. 53 p.
- 5 DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. 1973. Location of *Macrophomina phaseoli* on soybean plants related to culture characteristics and virulence. *Phytopathology* 63:934-936.
- 6 DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. 1973. Variation among isolates of *Macrophomina phaseoli*, *Rhizoctonia bataticola* from different regions. *Phytopathology* Z 76:200-204.
- 7 DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. 1977. An annotated bibliography of *Macrophomina phaseolina*, 1905-1975. Brasil, Universidad Federal de Viçosa. 244 p.
- 8 FRANCO, A.D. 1984. *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid, agente causal de la pudrición carbonosa del frijol, *Phaseolus vulgaris* L., en el Norte de Tamaulipas. *Agric Tec Mex* 10:87-98.
- 9 ILYAS, M.B.; ELLIS, M.A.; SINCLAIR, J.B. 1976. Effects of soil fungicides on *Macrophomina phaseolina* sclerotium viability in soil and in soybean stem pieces. *Phytopathology* 66:355-359.
- 10 KENDRICK, J.B. 1933. Seedling stem blight of field beans caused by *Rhizoctonia bataticola* at high temperatures. *Phytopathology* 23:949-963.
- 11 KHAN, A.L.; FAKIR, G.A.; THIRUMALCHAR, J.M. 1976. Comparative pathogenicity of 2 strains of *Macrophomina phaseolina* from sesame. *Bangladesh J. Bot* 5:77-81.
- 12 KHARE, M.N.; JAIN, N.K.; SHARMA, H.C. 1970. Variation among *Rhizoctonia bataticola* isolates from urd bean plant parts and soil. *Phytopathology* 60:1298.
- 13 LUTTRELL, E.S.; GARREN, K.H. 1952. Blights of snap beans in Georgia. *Phytopathology* 42:607-613.
- 14 MAGALHAES, A.A. DE; CHOUDHURY, M.M.; MILLAR, A.A.; ALBUQUERQUE, M.M. DE. 1982. Efecto del deficit de agua en el suelo en el ataque de *Macrophomina phaseolina* en frijol. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira Serie Agronomia* 17:407-411.
- 15 PAPAIVIZAS, G.C.; KLAG, N.G. 1975. Isolation and quantitative determination of *Macrophomina phaseolina* from soil. *Phytopathology* 65:182-187.
- 16 PASTOR-CORRALES, M.A.; ABAWI, G.S. 1986. Evaluation of selected bean accessions for resistance to *Macrophomina phaseolina*. *Phytopathology* 76:1087.
- 17 SCHWARTZ, H.F. 1980. Miscellaneous fungal pathogens. In *Bean production problems: Disease, insect, soil and climatic constraints of Phaseolus vulgaris*. Ed. by Schwartz, H.F., Galvez, G.E. Cali, Col., CIAT. 424 p.
- 18 TOMPKINS, C.M.; GARDNER, M.W. 1935. Relation of temperature to infection of bean and cowpea seedlings by *Rhizoctonia bataticola*. *Hilgardia* 9:219-230.

Notas y Comentarios

Alga que se esconde de noche para sobrevivir

Las plantas han desarrollado toda clase de defensas contra los animales que se alimentan de ellas, sustancias químicas de sabor desagradable, espinas, refugios para albergar a agresivas hormigas guardianas, y muchas formas más. Pero, una de las tácticas más brillantes ha sido descubierta recientemente en una alga que usa la oscuridad de la noche como una defensa contra los peces.

Una alga tropical, *Halimeda*, crece en lujuriantes y suculentas alfombras sobre los arrecifes de coral, don-

de viven muchos peces herbívoros. Mark Hay, de la Universidad de North Carolina, y un equipo de biólogos británicos y norteamericanos notaron que la *Halimeda* era dejada sola mientras otras plantas marinas eran devoradas.

Previamente, los científicos pensaban que, debido a que *Halimeda* está fuertemente encostrada con carbonato de calcio y sustancias químicas defensivas tenía una armadura propia contra los peces.

Hay y sus colegas encontraron que, al revés de otras plantas terrestres o marinas, *Halimeda* no crecía

más rápido durante el día. Midieron los números y longitudes de algunas frondas seleccionadas (el equivalente algal de una hoja), cada cuatro horas durante 56 horas. Encontraron que los nuevos segmentos de fronda sólo aparecían durante la noche, cuando los peces estaban menos activos

Pero, al siguiente día, los nuevos segmentos se habían expandido, endurecido con el calcio, cambiado de color y comenzado a llenarse de sustancias químicas que disuaden a los peces a que las comiesen.

Los investigadores concluyeron que la etapa más vulnerable de desarrollo ocurre bajo la cubierta de la noche (*Oecologia*, Vol. 75, p. 233).

Quizás, el aspecto más notable de este proceso es el repentino cambio de color de las frondas jóvenes, de transparentes a verde oscuro, justamente antes de la salida del sol. Sólo cuando aparece la aurora, la fronda necesita comenzar a fotosintetizar y a proveer a la planta con nuevos azúcares. Los investigadores construyeron un modelo de arrecife de coral en su laboratorio, para estudiar los efectos sobre *Halimeda* de los cambios de luz o de sustancias en el agua de mar. Encontraron que el cambio repentino de color es provocado por la salida del sol.

Ahora que el crecimiento nocturno ha sido descubierto en *Halimeda*, la búsqueda está ahora dirigida a casos de otras variedades de algas que se comportan de esta manera. A.G.

Valor Nutritivo del Fruto del Arbol de Conacaste (*Enterolobium cyclocarpum*) en Bovinos Jóvenes¹

M.A. Ortiz*, J.M. González**, R. Bressani***

ABSTRACT

Pods, seeds, and whole roasted fruit of the conacaste tree were analyzed for their chemical composition. The seeds contained 21.10% protein and 11.0% crude fiber, while the whole fruit analyzed 17.9 and 15.3% protein and fiber, respectively. The pods alone contained 8.80% protein and 14.60% fiber. Results of analysis for fiber fractionation and *in vitro* digestibility of the raw fruit (pods and seeds) and of the pods and seeds separately suggested they could be used as animal feed. An *in vivo* digestibility trial with the roasted material was conducted with eight Holstein calves, four male and four female, using as reference a basic diet similar in composition but without conacaste. Average digestibility *in vivo* for the diet containing conacaste was 69.47%, and was 74.04% for the reference diet. A feeding trial for a 45-day period was also carried out with the same animals. The diets were provided *ad libitum*. The animals that consumed the conacaste fruit gained 1.10 kg/day, while the controls gained 1.67 kg/day. Differences in digestibility and daily weight gain were not statistically significant. It was concluded that conacaste fruit may be useful in ruminant feeding.

INTRODUCCION

La baja disponibilidad en Guatemala de fuentes de proteína para la alimentación bovina justifica la búsqueda de nuevas fuentes. Se han evaluado varios recursos forestales, con énfasis en leguminosas arbóreas como *Gliricida* y *Erythrina* (2), cuyas partes vegetativas son ricas en proteína. Sin embargo, los frutos de estas especies no han recibido mucha atención. El conacaste (*Enterolobium cyclocarpum*) es un recurso forestal tipo leguminosa que es valioso por su madera. El fruto del árbol de conacaste, disponible durante los meses de abril a junio, lo consume el ganado perfectamente; sin embargo, en la actualidad se tiene muy poca información sobre su valor nutritivo, lo que no permite usarlo en forma efectiva, ya sea sólo o como parte de una ración.

¹ Recibido para publicación el 13 de junio 1988

* Coordinador del Programa Convenio Instituto Centroamericano de Tecnología de Alimentos (ICTA/Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP), con sede en el INCAP Guatemala.

** Investigador a cargo de la Finca Experimental del INCAP

*** Coordinador de la Investigación del INCAP y Jefe de la División de Ciencias Agrícolas y de Alimento Guatemala

COMPENDIO

El presente estudio se llevó a cabo para ampliar los conocimientos sobre la composición química del fruto del árbol de conacaste y sondear la posibilidad de utilizarlo en alimentación de bovinos. Para tal fin se analizaron muestras del fruto tostado, del fruto completo crudo, de la vaina y de la semilla por su contenido de nutrientes mayores. La semilla contenía 21.10% de proteína y 11.00% de fibra cruda mientras que el fruto completo contenía 17.90 y 15.30% de proteína y fibra, respectivamente. La vaina demostró tener 8.80% de proteína y 14.60% de fibra. El material crudo fue también analizado por fraccionamiento de la fibra y por digestibilidad *in vitro*, sugiriendo los datos que el fruto completo o sus partes anatómicas individuales podrían tener perspectivas útiles en la alimentación animal. Un estudio de digestibilidad *in vivo* con el material tostado fue llevado a cabo con ocho bovinos jóvenes (cuatro machos y cuatro hembras), usando como referencia una dieta con una composición química similar pero sin fruto de conacaste. El promedio de la digestibilidad *in vivo* fue de 69.47% para la dieta con fruto de conacaste y de 74.04% para la dieta testigo, diferencia que no fue estadísticamente significativa. Además, se hizo un estudio de alimentación *ad libitum* por un periodo de 45 días, en el cual se encontró que los animales alimentados con la dieta de fruto de conacaste ganaron 1.10 kg/día y los del grupo testigo 1.67 kg/día, diferencia que no fue estadísticamente significativa. Aunque se reconocen las limitaciones del estudio, la evidencia indica que el fruto de conacaste tiene buenas posibilidades para ser utilizado en la alimentación de bovinos.

En la literatura aparecen muy pocos trabajos sobre el valor nutritivo de este recurso, refiriéndose la mayoría de ellos a su composición química pero casi ninguno incluye ensayos biológicos, con excepción del estudio realizado por Bressani *et al* (3), en el cual, además de hacer un análisis amplio de la composición química de la semilla, se hizo una evaluación biológica en ratas y pollos

La falta de información sobre la composición química de este fruto, motivó este trabajo para: (i) determinar en bovinos su digestibilidad tanto *in vitro* como *in vivo*, y (ii) estudiar el comportamiento de bovinos jóvenes al ser alimentados con dietas preparadas con este fruto, durante un periodo de 45 días.

MATERIALES Y METODOS

Para llevar a cabo el presente estudio se recogieron frutos de conacaste en la costa sur de Guatemala y se llevaron al laboratorio para su procesamiento. Parte

del fruto entero fue fraccionado manualmente para separar la semilla de la vaina, dando origen a tres muestras, a las cuales se les fraccionó en la dimensión celular, de acuerdo a la metodología de Goering y Van Soest (4) luego, se determinó la digestibilidad *in vitro* utilizando el método de Tilley y Terry, modificado por Soering y Van Soest (4)

Posteriormente y con el propósito de reducir o inactivar posibles factores antinutricionales, el fruto completo se tostó a 185°C durante diez minutos en un tostador rotatorio de café, tiempo en el cual dejó de producir explosiones que fueron inducidas por el rompimiento de la cáscara de la semilla al expanderse el vapor de agua interno. Luego, el material tratado térmicamente se molió y se analizó químicamente (1).

Seguidamente, se hizo un ensayo de digestibilidad *in vivo* con bovinos para lo cual se preparó una ración que contenía un 30% del fruto de conacaste tostado y se comparó con una ración testigo que tenía el mismo nivel de proteína y fibra, pero que su proteína provenía principalmente de soya extruida (Cuadro 1). Ambas raciones fueron ofrecidas a ocho animales Holstein, cuatro machos y cuatro hembras, distribuidos por peso y sexo en dos grupos, de tal manera que la mitad se alimentó con la ración a base de conacaste y la otra con la ración testigo. Estos animales tuvieron un periodo de adaptación de 15 días; luego, pasaron al periodo metabólico para la recolección cuantitativa que duró cuatro días. La recolección de materiales fecales de cada animal se hizo por un periodo total de 24 horas; tales materiales fueron homogenizados y pesados, tomando el 10% del peso para hacer análisis químicos

Debido a que los resultados obtenidos en las fases anteriores fueron bastante satisfactorios, posteriormente se logró obtener suficiente fruto de conacaste para alimentar estos mismos animales distribuidos de la misma manera con las raciones ya mencionadas (Cuadro 1), durante 45 días, para evaluar su comportamiento en términos de consumo de alimento, ganancia de peso y eficiencia de conversión alimenticia. En esta fase, los animales se pesaron en ayunas cada 15 días. Además, se llevó un registro diario del consumo de alimento.

RESULTADOS Y DISCUSION

Fraccionamiento celular

El fruto de conacaste entero (vainas + semilla) sin procesar, mostró un fraccionamiento celular bastante interesante, como se puede observar en el Cuadro 2. Está formado principalmente por los carbohidratos estructurales celulosa (15.77%) y hemicelulosa

(10.88%), los cuales aparentemente se encuentran poco lignificados (6.23%) y por lo tanto, están disponibles para ser utilizados como fuente de energía por los rumiantes, teniendo además un contenido proteínico de 12.9% el cual se considera bueno.

El Cuadro 2 también describe el contenido de algunos compuestos en la vaina y en la semilla. La vaina contiene 9.7% de proteína, 6.11% de hemicelulosa, 16.70% de celulosa y 7.73% de lignina, mientras que la semilla contiene 16.6% de proteína, 19.16% de hemicelulosa, 12.56% de celulosa y 4.02% de lignina, siendo, desde este punto de vista, superior a la vaina y aporta la mayor cantidad de proteína al fruto entero. El alto contenido de hemicelulosa en la semilla posiblemente se debe a la cáscara que envuelve la almendra, la cual es rica en proteína, como se ha informado anteriormente (3). También, se encontró una excelente digestibilidad *in vitro* de la materia seca en el fruto entero de 81.76%, en la vaina de 70.32% y especialmente en la semilla (92.61%), hecho que concuerda muy bien con el fraccionamiento celular ya mencionado.

Digestibilidad *in vivo* del fruto de conacaste tostado

Para los fines del estudio, se sometió el fruto de conacaste a un proceso de tostado cuyo propósito fue el de destruir los posibles factores tóxicos que pudiera tener la semilla y que pudiesen interferir en la alimentación de los animales. Se puede señalar que, a nivel de campo, los animales consumen el fruto pero no digieren la semilla la cual se encuentra intacta en las materias fecales. El Cuadro 3 presenta el análisis proximal de un lote diferente al del Cuadro 2. Aunque existen diferencias en nutrimentos al comparar los datos del Cuadro 2 con los del 3, las tendencias de ambos son similares.

El contenido de nutrimentos de las raciones se presenta en la parte inferior del Cuadro 1. Se constata un poco más de grasa en la ración testigo que en la de fruto de conacaste (4.30% contra 2.10%), con un menor contenido de carbohidratos de tal manera que el contenido bruto de energía fue similar entre las dos raciones (2.47% kcal/100 g). La ración testigo acusó un mayor contenido de cenizas.

Para llevar a cabo esta fase del estudio, fue necesario superar muchas limitaciones siendo una de ellas la poca cantidad de fruto de conacaste con que se contaba, situación que obligó a utilizar un número muy pequeño de animales, lo cual afectó el grado de confiabilidad de las inferencias obtenidas. No obstante, el estudio permitió efectuar una buena comparación entre la digestibilidad presentada por la ración a base de conacaste y la ración testigo proporcionando, además,

Cuadro 1. Raciones experimentales.

Ingredientes	Conacaste	Testigo
Rastrojo de maíz molido	25.00	33.75
Heno de paja de arroz	15.00	15.00
Melaza	20.00	20.00
Fruto de conacaste	30.00	-
Harina de soya extruida	-	8.00
Maíz molido	6.75	10.00
Afrecho de trigo	-	10.00
Harina de hueso	0.25	0.25
Sal común	0.50	0.50
Carbonato de calcio	0.25	0.25
Premix mineral	0.25	0.25
Urea	2.00	2.00
Totales	100.00	100.00
Proteína calculada (%)	12.74	12.74
Energía calculada, kcal/100 g	2.47	2.47
Composición química (%)		
Humedad	10.20	11.10
Extracto etéreo	2.10	4.30
Fibra cruda	23.20	23.30
Proteína (N x 6.25)	13.26	13.30
Cenizas	7.80	9.10
Carbohidratos	43.10	38.90

una información más real que la que se pudo haber obtenido por los métodos *in vitro*.

En términos generales, se constató una digestibilidad de 69.47 y 74.0% para las raciones de conacaste y testigo, respectivamente (Cuadro 4), diferencia que no fue significativa ($P < 0.05$) (Cuadro 5). Asimismo, se observó una digestibilidad de 72.95 y 70.58% para

los machos y las hembras respectivamente (Cuadro 4), diferencia que tampoco fue significativa ($P < 0.05$) (Cuadro 5).

Para cuantificar el error existente entre las dos evaluaciones realizadas en cada animal, se tomaron como repeticiones las digestibilidades obtenidas por animal en cada uno de los cuatro días que duró la fase de recolección con el objeto de hacer un análisis de varianza. Así, al incluir en el análisis el día en que se realizó la evaluación como variable independiente, se observó que a través del tiempo la digestibilidad se incrementa y que después de alcanzar un punto máximo vuelve a bajar (Fig. 1). Este efecto, probablemente, se debe al azar o a otro factor que no fue

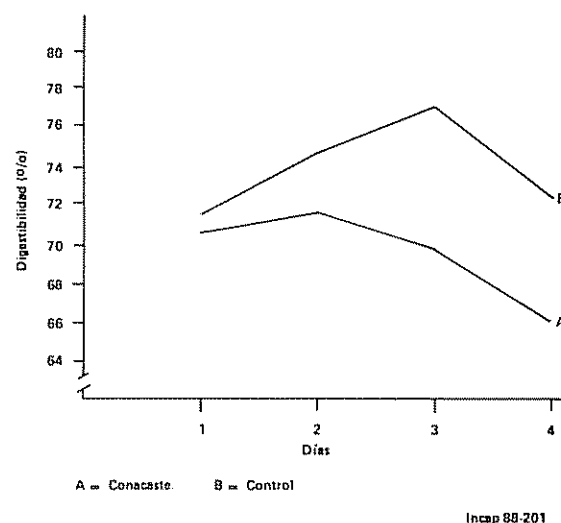


Fig. 1. Digestibilidad de la materia seca de acuerdo a la dieta.

Cuadro 2. Composición química y digestibilidad *in vitro* de la materia seca del fruto de conacaste sin procesar.

Muestra	M.S.	P.C.	Cenizas	FND	FAD	Hemicelulosa %	Celulosa	Lignina	DIVMS
Vaina con semilla*	92.7	12.9	4.60	32.88	22.00	10.88	15.77	6.23	81.76
Vaina sin semilla	92.5	9.7	4.80	30.55	24.44	6.11	16.70	7.73	70.32
Semilla	92.1	16.6	3.50	35.74	16.58	19.16	12.56	4.02	92.61

* Fruto completo

M.S. = Materia seca
P.C. = Proteína cruda
FND = Fibra neutro detergente
FAD = Fibra ácido detergente
DIVMS = Digestibilidad *in vitro* de la materia seca

considerado en el estudio. Sin embargo, a pesar de que la digestibilidad de las raciones se modifica en forma cuadrática a través del tiempo, las raciones no son significativamente diferentes en su comportamiento ($P < 0.05$) (Cuadro 6 y Fig. 1).

Esta respuesta se complica aún más al analizar en conjunto el efecto que provocan sobre la digestibilidad las variables independientes: ración, día y sexo, pues, además de que la digestibilidad de las raciones es modificada en forma cuadrática a través del tiempo, la cuadratura tiende a ser diferente para cada uno de los sexos en particular (Cuadro 6 y Fig. 2).

Debido a que no fue posible mantener un consumo fijo de alimentos se realizó un análisis de covarianza para cuantificar el efecto que el consumo de alimento ejerce sobre la digestibilidad. En el presente estudio, no hubo efecto del consumo sobre la digestibilidad ($P < 0.05$) (Cuadro 7).

Consumo de alimento, ganancia de peso y eficiencia de conversión alimenticia

El Cuadro 8 presenta la ganancia de peso que alcanzaron los animales de acuerdo a la dieta que consumieron durante 45 días. Se encontró que los anima-

Cuadro 3. Composición química del fruto de conacaste tostado (%).

	Fruto completo	Vaina	Semilla
Materia seca	96.40	76.60	89.80
Fibra cruda	15.30	14.60	11.00
Proteína (N x 6.25)	17.90	8.80	21.10
Grasa	2.60	0.80	1.60
Cenizas	4.40	2.60	3.80

Cuadro 4. Digestibilidad *in vivo* de la materia seca (%) de las raciones a base de conacaste y testigo, de acuerdo al sexo y al día en que se realizó la evaluación.

Dieta	Sexo	Días				Media total
		1	2	3	4	
Conacaste	M	75.72	74.57	73.90	71.58	73.94
	M	73.24	65.85	67.10	63.72	67.43
	Media	74.48	70.21	70.50	67.65	70.69
	H	62.82	72.75	66.44	61.30	65.83
	H	69.60	73.84	71.79	67.63	70.72
	Media	66.21	73.30	69.12	64.47	68.28
Media		70.35	71.75	69.81	66.06	69.47
Testigo	M	71.14	76.01	77.22	78.45	75.71
	M	70.79	77.14	76.84	73.94	74.68
	Media	70.97	76.58	77.03	76.20	75.20
	H	72.78	74.18	77.53	75.43	74.98
	H	71.86	71.85	76.82	62.59	70.78
	Media	72.32	73.02	77.18	69.01	72.88
Media		71.64	74.80	77.10	72.60	74.04
Media total		71.00	73.28	73.46	69.33	71.76

M = Macho

H = Hembra

les que consumieron la dieta testigo ganaron 1.67 kg por día, mientras que los que consumieron el fruto de conacaste, solamente ganaron 1.10 kg por día; sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Cuadro 9)

El consumo de alimento fue de 9.11 y 9.30 kg por día para la dieta de conacaste y testigo, respectivamente (Cuadro 8), diferencia que tampoco fue estadísticamente significativa (Cuadro 9).

La eficiencia de conversión alimenticia fue de 9.21 y 7.31 para la dieta a base de conacaste y testigo, res-

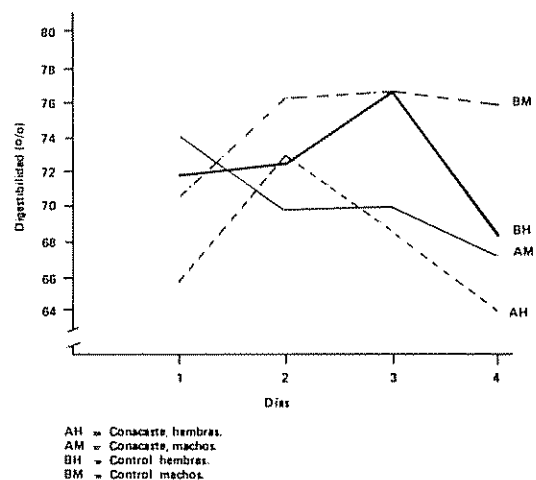


Fig. 2. Digestibilidad de la materia seca de acuerdo a la dieta y al sexo.

pectivamente (Cuadro 8), siendo esta diferencia no significativa (Cuadro 9).

Cuadro 5. Andeva general de la digestibilidad (*in vivo*) de la materia seca, de acuerdo a la ración y al sexo.

Fuente de variación	S.C.	C.M.	F.	Sig.	(F)
Dieta (D)	165.256		3.92	0.119	NS
Sexo (S)	45.125		1.07	0.360	NS
D X S	0.325103 E-01		0.00	0.979	NS
Error	168.759	42.190			

NS = No significativo.
S.C. = Suma de cuadros.
S.M. = Cuadros medios.

Cuadro 6. Andeva de la cuadratura de la digestibilidad (*in vivo*) de la materia seca, de acuerdo a la ración y al sexo, a través del tiempo.

Fuente de variación	S.C.	C.M.	F	Sig.	(F)
Dieta (D)	3.113		0.46	0.536	NS
Sexo (S)	30.303		4.45	0.102	NS
D X S	14.418		2.12	0.219	NS
Error	27.214	6.753			

NS = No significativo

Cuadro 7. Análisis de covarianza de la digestibilidad de la materia seca, en relación al consumo de alimento.

Fuente de variación	S.C.	C.M.	F	Sig.	(F)	r
Dieta (D)	164.7995		2.99	0.1820		
Sexo (S)	46.0426		0.84	0.4279		
D X S	0.56497		0.01	0.9257		
Covarianza	3.5973		0.07	0.8148	NS	-0.18765
Error	165.1620	55.054				
R	82.6316		3.77	0.044		
R dieta	47.8959		2.19	0.1473		
R sexo	31.9827		1.46	0.2789		
R X D X S	78.2248		3.57	0.0506		
Covarianza	0.68929		0.09	0.7644	NS	-0.35356
Error	80.3440	7.304				

NS = No significativo
R = Residual.

Cuadro 8. Comportamiento de los animales alimentados por un período de 45 días de acuerdo a la ración que consumieron.

Dieta	Sexo	Ganancia de peso (kg/día) (quincena)				Consumo de alimentos (kg/día) (quincena)				Eficiencia alimenticia (quincena)			
		1	2	3	- x	1	2	3	- x	1	2	3	- x
Conacaste	M-	1.17	1.40	1.03	1.20	7.17	8.98	9.43	8.53	6.14	6.41	9.13	7.23
	M-	0.80	1.20	0.53	0.84	7.87	9.42	9.71	9.00	9.83	7.85	18.20	11.96
	M-	1.47	1.40	1.87	1.58	8.93	12.70	13.66	11.76	6.09	9.07	7.32	7.49
	M-	1.00	0.60	0.67	0.76	5.79	7.33	8.34	7.15	5.79	12.22	12.51	10.17
Media		1.11	1.15	1.03	1.10	7.74	9.61	10.29	9.11	6.96	8.89	11.79	9.21
Testigo	M-	3.13	1.33	2.20	2.39	10.09	11.10	12.59	11.26	3.22	6.05	5.72	5.00
	M-	2.40	0.93	1.13	1.49	8.11	8.86	9.93	8.97	3.38	9.49	8.76	7.21
	M-	2.40	0.83	1.37	1.53	9.11	9.33	10.25	9.56	3.79	11.20	7.50	7.50
	M-	2.50	0.47	0.80	1.24	6.85	7.45	7.95	7.42	2.74	15.96	9.94	9.55
Media		2.61	1.02	1.38	1.67	8.54	9.19	10.18	9.30	3.28	10.68	7.98	7.31

Cuadro 9. Resumen de los análisis de varianza realizados para evaluar la diferencia entre la ración de conacaste y la ración testigo, respecto a la ganancia de peso, consumo de alimento y eficiencia de conversión alimenticia.

Anovas	SC	F	Sig.	(F)
Ganancia de peso	1.96	3.08	0.154	NS
Consumo de alimento	7.84	1.95	0.235	NS
Conversión alimenticia	21.68	1.49	0.289	NS

NS = No significativo

Por lo tanto, se concluye que el fruto de conacaste tostado tiene un buen potencial en la alimentación de bovinos en crecimiento, pues mostró un consumo de alimento y una ganancia de peso relativamente buena, aunque la eficiencia de conversión alimenticia no fue tan satisfactoria como en la dieta testigo. Sin embargo, se debe considerar que, en nuestro medio, la dieta a base de soya resulta mucho más costosa y bien vale la pena sacrificar un poco esta eficiencia de conversión.

LITERATURA CITADA

1. ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. 1960. Official methods of analysis. 9 ed. Washington, D.C.
2. BOREL, R. 1986. Potencial de la utilización de árboles leguminosas para la alimentación animal. In Memorias de un simposio necesidades actuales y futuras de alimentos básicos en Centroamérica y Panamá. Guatemala, INCAP p. 381-398.
3. BRESSANI, R. *et al.* 1966. Análisis químico de la harina de almendra de conacaste (*Enterolobium cyclocarpum*) y su evaluación biológica en ratas y pollos. Turrialba 16(4):330-339.
4. GOERING, H.K.; VAN SOEST, P.J. 1970. Forage fiber analysis. Washington, D.C., United States Department of Agriculture (Agriculture Handbook no. 379).

Determinação do Nível Crítico de Mo nos Nódulos de Feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)¹

J. Jacob-Neto*, A. Franco**

ABSTRACT

Two experiments were performed in a greenhouse with beans (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Carioca to determine the critical level of Mo in the nodules of plants dependent on symbiotic nitrogen fixation. The experiments were randomized complete block designs with several treatments of added Mo and two pH levels (4.9 and 5.5) in one experiment. Plants were harvested at early flowering and Mo concentration was determined in the nodules, roots, shoots and seeds. The nitrogenase activity (acetylene reduction) of nodules and total nitrogen in the plant was also determined. At pH 5.5 plants accumulated more Mo than at pH 4.9. Addition of Mo to the soil increased the concentration of Mo in the nodules and the efficiency of the biological nitrogen fixation process. The critical level of Mo determined in the nodule was 3.66 $\mu\text{g Mo.g dry nodules}^{-1}$.

RESUMO

Foram conduzidos dois experimentos em casa de vegetação com o objetivo de estudar o nível crítico de Mo no tecido nodular de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Carioca, dependente do nitrogênio atmosférico. Os experimentos foram instalados em blocos ao acaso com diferentes níveis de Mo aplicados ao solo, sendo um dos experimentos em dois níveis de pH (4.9 e 5.5). As colheitas foram realizadas no início da floração, sendo feitas determinações da concentração de Mo nos nódulos, raízes, parte aérea e sementes, atividade da nitrogenase dos nódulos e nitrogênio total da parte aérea. Em pH (4.9) o feijoeiro absorveu menos Mo que no pH (5.5), sendo que a adição de Mo ao solo aumentou a concentração de Mo nos nódulos e a eficiência do processo de fixação biológica do nitrogênio. O nível crítico de Mo nos nódulos situou-se a 3.66 $\mu\text{g Mo.g nódulos secos}^{-1}$.

INTRODUÇÃO

Em leguminosas existe o requerimento de Mo para outros processos metabólicos da planta, contudo este requerimento é maior para a redução do nitrato e principalmente para a fixação biológica do nitrogênio (1, 4, 27, 30)

Com relação ao comportamento de Mo no solo, este elemento é extremamente dependente das variações de pH (28, 31) bem como de outros fatores, como material de origem, matéria orgânica e teores de óxidos de ferro e alumínio (2, 22), fazendo com que as determinações de níveis críticos desse elemento, sejam mais difíceis do que para outros micronutrientes. Vários métodos tem sido propostos (13) para extrair Mo do solo, desde que Grigg (11) relacionou Mo extraído com Mo absorvido pelas plantas. Entretanto a maioria desses métodos não apresentam boa correlação com a resposta da planta (13)

Johnson (19) sugeriu que se deva dar prioridade nos estudos com Mo, ao estabelecimento dos níveis críticos desse elemento nos tecidos das plantas.

Na maioria dos trabalhos com leguminosas as análises de Mo tem sido realizadas na parte aérea (10, 20) mesmo sendo os nódulos o local de maior requerimento (8, 16) Johansen (20) em trabalho com diversas leguminosas forrageiras encontrou que a concentração média de Mo na parte aérea foi de 0.02 ppm ou abaixo desse nível, o que dificultava a sua determinação pelo método utilizado no trabalho. Em feijoeiro nas condições de deficiência de Mo, os nódulos apresentam concentrações em torno de 10 vezes maiores que na parte aérea (8, 16) podendo facilitar assim sua determinação. Desta forma este trabalho objetiva determinar o nível crítico de Mo em nódulos de feijoeiro, como indicador de suficiência -- deficiência

¹ Recebido para publicação em 8 de agosto 1988
Projeto parcialmente financiado pela FINEP

* Eng.^o Agrônomo M. Sc., Bolsista do CNPq, Professor do Depto. Fitotecnia, UFRRJ, Km 47 da antiga Rio-SP, 23851, Seropédica, R. J.

** Pesquisador, PhD, EMBRAPA-UAPNPBS, Km 47, 23851, Seropédica, R. J.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos dois experimentos em casa de vegetação com feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar "Carioca", onde a temperatura média ambiente durante os 2 ciclos das plantas oscilavam em torno de 26°C, não ultrapassando os 33°C. O solo utilizado nos dois experimentos foi um Podzólico Vermelho

Amarelo – proveniente da fazenda Santa Mônica, Valença-RJ, coletado dos primeiros 20 cm de um perfil com cobertura vegetal predominantemente de gramíneas forrageiras.

O solo foi seco ao ar peneirado em malha de 1 cm², homogeneizado e distribuído 50 kg de solo por vaso no 1º experimento e 35 kg por vaso no 2º experimento. As análises físicas e químicas do solo foram realizadas com a metodologia descrita no manual de métodos de análises de solo EMBRAPA (6), com os seguintes resultados: pH em H₂O (1:2) 5,5, 0,2 ppm Cu, 0,7 ppm Fe, 0,9 ppm Mn, 0,7 ppm Zn, 0,1 mE/100 ml Al, 3,4 mE/100 ml Ca, 1,8 mE/100 ml Mg, 3 ppm P, 83 ppm K. A adubação foi realizada tomando-se por base 2000 t de solo por hectare, sendo adicionado por quilograma de solo nos 2 experimentos: 0,15 g de MgSO₄·7H₂O; 0,0158 g de CuSO₄·5H₂O; 0,0089 g de ZnSO₄·7H₂O; 0,0003 g de H₃BO₃; 0,02 g de FeSO₄·7H₂O, e separadamente 0,12 g de fósforo e 0,15 g de potássio aplicados como KH₂PO₄.

O solo foi irrigado diariamente com H₂O deionizada para atingir em torno de 80% de sua capacidade máxima de retenção de umidade.

O delineamento experimental utilizado no 1º experimento foi o de blocos ao acaso com 4 repetições e 5 tratamentos (40, 80, 160, 320 e 640 g ha⁻¹ de Mo). No 2º experimento foi utilizado um fatorial em delineamento experimental de blocos ao acaso com dois níveis de pH (4,9 e 5,5) e 5 níveis de Mo (0, 20, 40, 80 e 160 g ha⁻¹ de Mo). Para baixar o pH do solo foi utilizada como base uma curva de acidificação por incubação do solo com ácido sulfúrico por 72h, sendo a leitura de pH realizada em H₂O (1:2).

As sementes em ambos os experimentos foram inoculadas no momento do plantio com uma mistura de estirpes de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* CO.5 (CENA-Piracicaba-SP) + SEMIA 487 (IPAGRO-RS), crescidas em meio extrato de levedura agarizado (YMA) descrito por Vincent (32) semi-sólido, adicionando aproximadamente 10⁷ células por semente. Foram plantadas 4 sementes contendo 0,019 µg Mo semente⁻¹ em cada vaso e logo após a germinação foi realizado o desbaste deixando-se 2 plantas por vaso.

Após o plantio, o molibdênio foi aplicado sobre as sementes, na forma de molibdato de sódio. Nos dois experimentos foi realizada uma colheita no início da floração. No segundo experimento foi efetuada ainda uma colheita no final do ciclo, sendo determinado o peso e concentração de Mo nas sementes. As plantas foram cortadas rentes ao solo e após secagem em estufa com circulação de ar a 60°C por 72 horas,

foram determinadas na parte aérea nitrogênio total (21) e a concentração de molibdênio (18).

O sistema radicular com os nódulos foram separados do solo, determinando-se a atividade da nitrogênase pelo método de redução de C₂H₂, após incubação por 5 minutos (24). Posteriormente os nódulos foram destacados das raízes e ambos rigorosamente lavados com água deionizada, e feita a determinação de Mo como descrito anteriormente.

RESULTADOS

No experimento 1 (Tabela 1) a concentração de Mo nos nódulos aumentou de acordo com a adição de Mo, havendo uma tendência de estabilização com a adição de 320 g Mo ha⁻¹. Não havendo diferenças quanto ao Mo total dos nódulos por planta. Quanto aos demais parâmetros estudados, somente o peso de nódulos e N total acumulado nas plantas mostraram resposta entre o nível zero e os níveis de Mo aplicados. Estes resultados indicaram a necessidade de tratamentos com níveis mais baixos de Mo. Os resultados do segundo experimento mostraram que ocorreram efeitos individuais do pH e das dosagens de Mo na concentração de Mo nos nódulos, mas a interação entre esses dois fatores não foi significativa (Fig. 1, Tabela 2). A adição de Mo ao solo aumentou linearmente a concentração desse elemento nos nódulos das plantas, em ambos os níveis de pH (pH 4,9 r² = 0,99; pH 5,5 r² = 0,93). Não ocorrendo diferença significativa (Tukey p = 0,05) entre os níveis zero e 40 g Mo ha⁻¹ na análise isolada do pH 4,9, contudo ocorreram diferenças significativas pelo teste Tukey (p = 0,05) do nível zero (s/adicação Mo) para os demais, no pH 5,5. As mesmas variações acima foram observadas

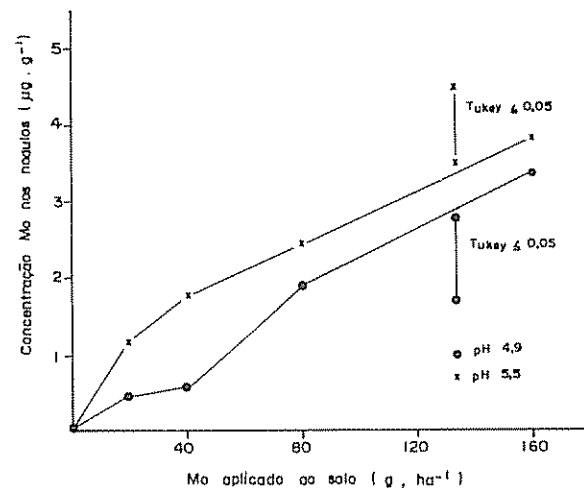


Fig. 1 Efeito da aplicação de Mo ao solo e do pH, na concentração de Mo nos nódulos (cada ponto é média de 5 repetições)

para o total de Mo nos nódulos (Fig. 2), mas não para o peso de nódulos (Fig. 6).

As concentrações de Mo encontradas nas raízes (Fig. 3) foram menores do que as encontradas nos nódulos, principalmente nos tratamentos de zero a 40 g ha⁻¹ de Mo, em ambos valores de pH. Nesta faixa as concentrações de Mo nas raízes foram muito pequenas, o que dificultou as análises de Mo pelo método utilizado no trabalho. A partir da dosagem de 40 g ha⁻¹ de Mo ocorreu um aumento súbito da concentração de Mo nas raízes, mas mesmo assim com valores em torno de 50% dos encontrados nos nódulos.

Os valores máximos da atividade da nitrogenase (Fig. 4 e 5) no pH 5.5 foram atingidos na dosagem de 40 g ha⁻¹ de Mo, sendo que neste tratamento a concentração de Mo nos nódulos foi de 1 82 µg Mo g nódulos secos⁻¹. Existiu efeito altamente significativo das dosagens de Mo na atividade da nitrogenase, contudo o efeito do pH só foi significativo na atividade específica da nitrogenase (Fig. 5), mesmo assim apenas na dosagem de 40 g ha⁻¹ de Mo (Tabela 2).

Os maiores valores dos pesos de nódulos ocorreram sempre no pH 4.9 (Fig. 6), existindo também efeito altamente significativo das dosagens de Mo. Na análise estatística isolada de cada pH, foi possível verificar que no pH 5.5 a partir da dosagem de 20 g ha⁻¹ de Mo não mais existiram diferenças significativas (Tukey p = 0.05) entre os pesos de nódulos.

O peso da parte aérea (Fig. 7) foi diretamente influenciado pelas dosagens de Mo, sendo também significativa a interação pH x Mo. Não existindo diferen-

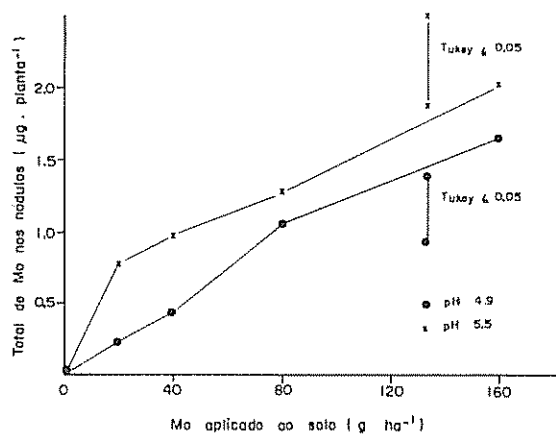


Fig. 2. Efeito da aplicação de Mo ao solo e do pH, no total de Mo nos nódulos (cada ponto é média de 5 repetições)

ças estatísticas significativas entre os pesos de raízes (Fig. 8) para nenhum parâmetro testado.

Com relação ao nitrogênio total na parte aérea (Fig. 9) não foram observados efeitos do pH sobre o conteúdo de nitrogênio, mas as dosagens de Mo foram importantes no aumento do teor de nitrogênio na parte aérea. Na análise isolada de cada pH, verificou-se pelo teste Tukey (p = 0.05) que no pH 4.9, não ocorreram diferenças entre os conteúdos de nitrogênio das dosagens zero à 40 g ha⁻¹ de Mo e entre 80 e

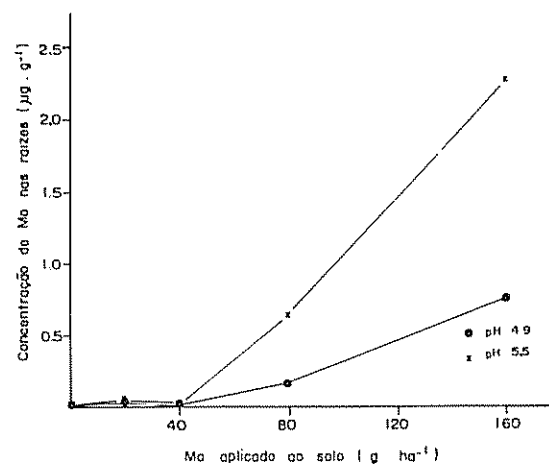


Fig. 3. Efeito da aplicação de Mo ao solo e do pH, na concentração de Mo nas raízes (cada ponto é média de 5 repetições).

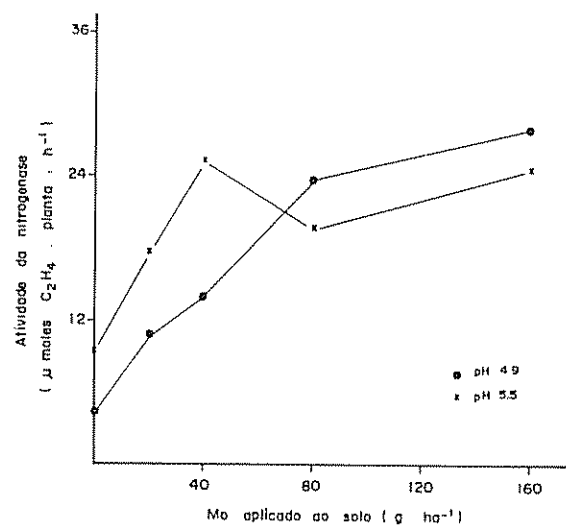


Fig. 4. Efeito da aplicação de Mo ao solo e do pH, na atividade da nitrogenase por planta (cada ponto é média de 5 repetições)

160 g.ha⁻¹ de Mo. Sendo que no pH 5.5 já a partir de 40 g.ha⁻¹ de Mo não mais existiram diferenças entre os teores de nitrogênio total. A equação que melhor definiu o acúmulo de nitrogênio de acordo com as dosagens de Mo no pH 5.5 foi: $y = 36.447 + 2.167x - 0.009x^2$ ($r^2 = 0.95$) de onde pode ser estimado que o máximo de acumulação de N na parte aérea de 160.30 mg.planta⁻¹ poderia ser obtida com a aplicação de 114.3 Mo.ha⁻¹. Para o pH 4.9 a equação foi: $y = 49.839 + 0.773x$ ($r^2 = 0.80$) mostrando que neste pH mesmo nos níveis mais altos ainda não havia atingido resposta máxima.

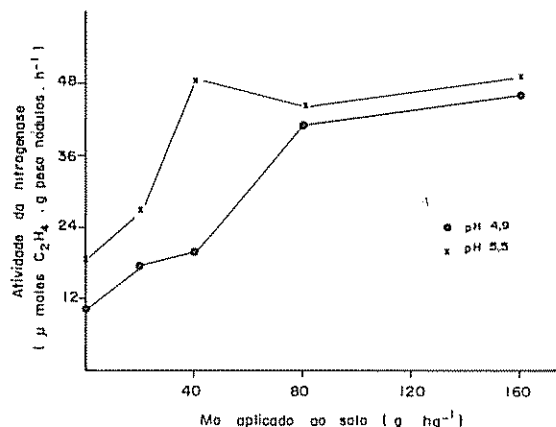


Fig. 5 Efeito da aplicação de Mo ao solo e do pH, na atividade específica da nitrogenase. (cada ponto é média de 5 repetições).

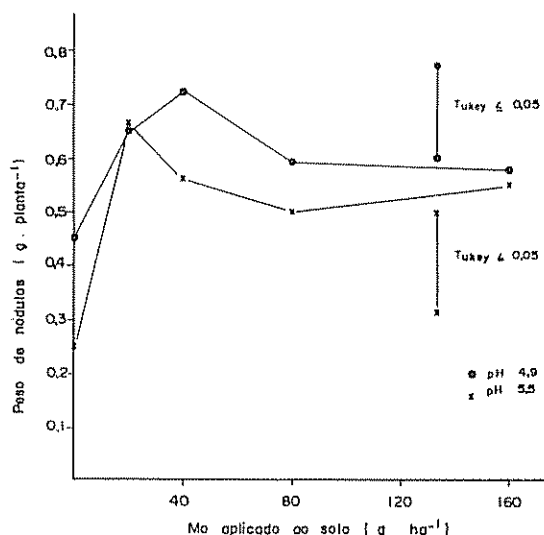


Fig. 6. Efeito da aplicação de Mo ao solo e do pH, no peso de nódulos (cada ponto é média de 5 repetições).

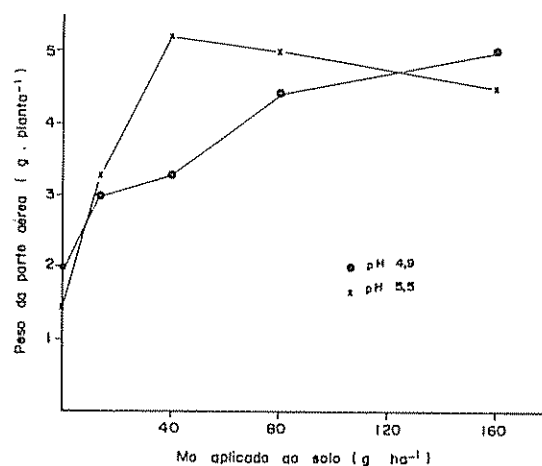


Fig. 7. Efeito da aplicação de Mo ao solo e do pH, no peso da parte aérea. (cada ponto é média de 5 repetições).

Na Fig. 10 foi correlacionado o nitrogênio total na parte aérea com as concentrações de Mo nos nódulos. Observou-se que nos valores mais baixos de Mo existiu uma correlação linear entre essas duas concentrações, contudo acima de 3.66 µg Mo g nódulos secos⁻¹, não havia mais resposta do acúmulo de nitrogênio com o aumento da concentração de Mo nos nódulos. Esta concentração (3.66 µg Mo g nódulos secos⁻¹) corresponde ao ponto de inflexão da curva.

Os pesos de sementes por planta (Fig. 11) foram influenciados pelos valores de pH e pelas dosagens de Mo, sendo também significativa a interação Mo x pH. Os maiores valores dos pesos de sementes foram encontrados no pH 5.5.

Pela metodologia usada e com o material disponível, só foi possível detectar Mo nas sementes provenientes dos níveis 80 e 160 g.ha⁻¹ de Mo no pH 4.9 e a partir de 40 g.ha⁻¹ no pH 5.5 (Tabela 3). O mesmo ocorreu com a concentração de Mo na parte aérea (dados não apresentados), no pH 5.5.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no primeiro experimento indicaram que as dosagens de Mo para determinação do nível crítico, deveriam ser ampliada na faixa inferior, o que foi realizado no segundo experimento.

As concentrações de Mo nos nódulos da planta de feijoeiro no segundo experimento, variaram com o pH e com as dosagens de Mo, não sendo significativa a interação pH x Mo, indicando que esses fatores agiram independentemente sobre o conteúdo de Mo nos nódulos (Fig. 1, Tabela 2). As maiores concen-

Tabela 1. Resultados da colheita realizada na floração do experimento I (Médias de 4 repetições com 2 plantas por vaso).

Tratamento g.ha ⁻¹ de Mo	Concentração (µg Mo)		Peso (g.planta seca ⁻¹)			ARA ^a (µmoles C ₂ H ₄)		Nitrogênio total parte aérea (mg.planta ⁻¹)
	g nódulos secos ⁻¹	nos nódulos planta ⁻¹	nódulo	raiz	parte aérea	planta	g.nódulos	
40	2.27 d	0.71	0.32 a	0.35	3.61	2.33	7.34	81.47 b
80	5.16 cd	0.97	0.16 b	0.55	4.93	0.98	7.64	99.72 ab
160	7.23 bc	1.25	0.19 b	0.51	4.21	1.86	9.31	112.69 ab
320	12.79 a	2.14	0.18 b	0.61	3.74	1.88	11.22	110.65 ab
640	11.51 ab	1.64	0.14 b	0.38	4.35	1.34	12.93	131.77 a
Tukey (5%)	4.53	1.77	0.10	0.28	1.45	1.36	8.70	41.6
C.V. (%)	26	47	24	24	15	36	40	17

a Atividade da nitrogenase medida pela redução do acetileno com incubação de 5 minutos

trações de Mo foram encontradas no pH 5.5 e aumentaram linearmente com a adição de Mo. Franco e Day (7) verificaram que as respostas à simbiose à fertilização com Mo foram dependentes do pH, sendo significativa a interação Mo x calagem. Contudo Franco e Munns (8) não encontraram efeito do pH nem da interação pH x Mo, mas encontraram efeito significativo das dosagens de Mo na concentração de Mo nos nódulos. A diminuição do pH como ocorrido neste trabalho, pode ter afetado a absorção de cátions e ânions pelas raízes, bem como a sobrevivência e multiplicação de *Rhizobium* na rizosfera (3) e iniciação dos nódulos (9). Os maiores valores de pesos de nódulos foram encontrados no pH 4.9 provavelmente devido a deficiência de Mo. Com o abaixamento do

pH as formas de Mo devem ter sido adsorvidas nos colóides do solo (31) ficando menos disponíveis para as plantas. Mulder (26) verificou que o número de nódulos de trevo e alfafa cultivados em solos deficientes de Mo, eram maiores do que quando cultivados em solos com suprimento de Mo, todavia eram nódulos menos eficientes, como ocorreu aqui neste trabalho (Fig. 5). Outros autores também tem observado o mesmo (5, 7).

Os menores valores da atividade da nitrogenase encontrados nos níveis mais baixos de Mo (Figs. 4 e 5) caracterizam a importância desse elemento para essa atividade enzimática. Apesar dos altos coeficientes de variação geralmente encontrados e das críticas que se

Tabela 2. Análise de variância (Valores F) do experimento I. Colheitas na floração plena.

Fonte de Variação	Concentração de Mo (µg)			ARA ^a (µmoles C ₂ H ₄)		Peso (g planta seca ⁻¹)				Nitrogênio total parte aérea (mg.planta ⁻¹)
	g.nódulo ⁻¹	No. nódulos planta ⁻¹	g.raízes ⁻¹	planta	g.nódulos secos ⁻¹	nódulo	raiz	parte aérea	sementes ^b	
Dosagem de Mo	60.45**	64.23**	39.88**	14.35**	7.41**	10.30**	2.37	29.21**	22.58**	43.53**
pH	14.51**	18.82**	19.62**	3.07	5.03*	8.25**	2.31	2.31	13.23**	0.74
pH x dosagem Mo	1.51	1.84	10.00**	2.99*	1.16	1.40	0.93	4.88**	2.95*	2.86*
C.V. (%)	36	32	83	32	45	21	23	20	48	24

a Atividade da nitrogenase medida pela redução do acetileno, por um período de incubação de 5 minutos em plantas colhidas 36 dias após o plantio

b Colheita realizada no final do ciclo (g.planta⁻¹).

* P ≤ 0.05

** P ≤ 0.01

fazem a essa medida enzimática (25, 33) seus valores neste trabalho estão de acordo com os trabalhos de Franco e Day (7) e Hungria (15). Ocorreu uma tendência de aumentar a concentração de nitrogênio na parte aérea e a atividade da nitrogenase com o aumento das dosagens de Mo

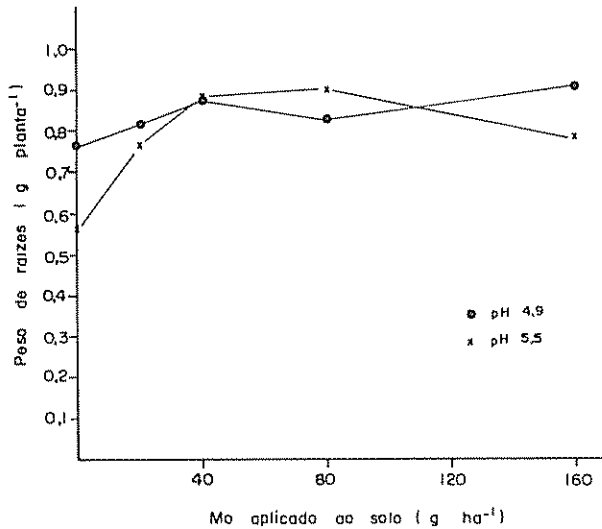


Fig 8 Efeito da aplicação de Mo ao solo e do pH, no peso de raízes (cada ponto é média de 5 repetições)

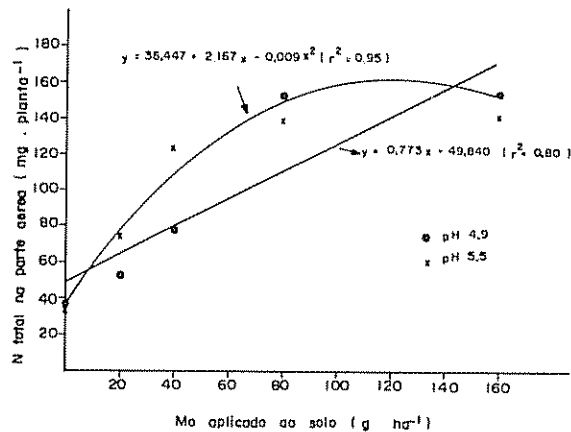


Fig 9 Efeito da aplicação de Mo ao solo e do pH; no nitrogênio total da parte aérea (cada ponto é média de 5 repetições)

Tabela 3. Concentração de Mo nas sementes de feijão adubado com diferentes dosagens de Mo (Média de 4 repetições).

pH do solo	Dosagem de Mo aplicada ao solo em g.ha ⁻¹	µg Mo.g sementes ⁻¹	µg Mo. semente
4.9	40	nd ^a	nd
	80	0.22 ± 0.08 ^b	0.05 ± 0.02
	160	0.40 ± 0.05	0.09 ± 0.02
5.5	40	0.14 ± 0.08	0.03 ± 0.02
	80	0.35 ± 0.09	0.08 ± 0.01
	160	0.79 ± 0.22	0.13 ± 0.04

a nd - não detectável pelo método utilizado

b desvio padrão das médias

Os resultados da concentração de Mo nas raízes confirmam os dados obtidos por Franco e Munns (8) e de Jacob-Neto *et al* (16) onde se observou menores concentrações de Mo nas raízes do que nos nódulos. O mesmo ocorreu com a parte aérea e sementes, onde só foi possível detectar Mo a partir de aplicação de 80 g.ha⁻¹ no pH 5.5. Mesmo assim na parte aérea só foi detectado Mo quando foi utilizado acima de 4 g de matéria seca para se fazer análise. A concentração encontrada na parte aérea na dosagem de 160 g.ha⁻¹ de Mo no Ph 5.5 foi de 0.47 µg Mo.g parte aérea seca⁻¹, resultado este próximo do encontrado por Johnson *et al* citado em Gupta e Lipsett (13) como suficiente para o desenvolvimento de plantas de feijão. Os resultados encontrados nas raízes, parte aérea e

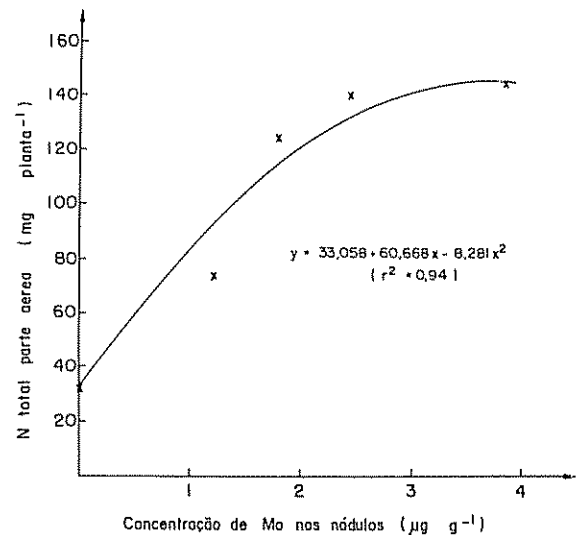


Fig 10 Efeito da concentração de Mo nos nódulos no nitrogênio total da parte aérea, no pH 5.5 (cada ponto é média de 5 repetições)

sementes, indicam que se deva utilizar os nódulos para determinar o nível crítico de Mo em leguminosas fixando nitrogênio atmosférico.

No primeiro experimento o nível crítico de Mo nos nódulos para máxima acumulação de N em plantas dependentes da simbiose ficou entre 2,27 e 5,16 $\mu\text{g Mo.g nódulos secos}^{-1}$. Com os resultados do segundo experimento foi possível determinar com mais precisão o valor de 3,66 $\mu\text{g Mo.g nódulos secos}^{-1}$ que está dentro da faixa de 3 a 5 $\mu\text{g Mo.g nódulos secos}^{-1}$ sugerida por Franco e Munns (8).

Franco e Day (7) verificaram que além da adição de Mo neste solo, a calagem exercia um importante papel no aumento de produção do feijoeiro, quando o pH foi elevado acima de 5,8. A calagem pode eliminar a deficiência de Mo pela liberação deste elemento dos colóides para a solução do solo (13, 17) facilitando desse modo a absorção pelas plantas. Autores como Parker e Harris (27), Hawes *et al.* (14), Gupta e Kunelius (12) e Franco e Munns (8) demonstraram a importância da calagem no aumento da concentração de Mo nos tecidos das plantas. Em teste

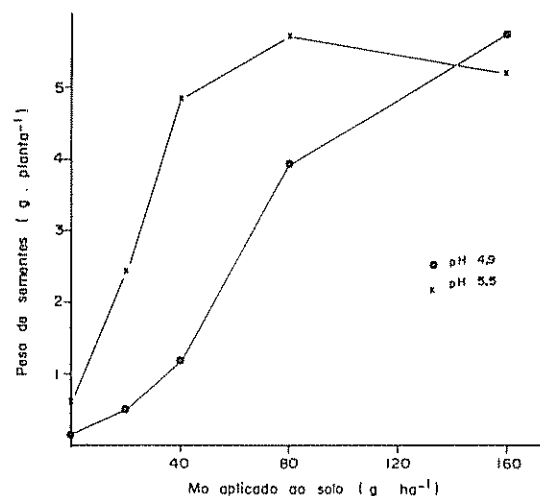


Fig. 11 Efeito da aplicação de Mo ao solo e do pH, no peso de sementes por planta (cada ponto é média de 5 repetições).

realizado em separado com este solo, foram adicionados 500 kg ha⁻¹ de calcário dolomítico elevando-se o pH para 5,9, utilizando-se as mesmas adubações dos experimentos I e II, sem adicionar Mo. Através deste teste foi possível verificar que as plantas de feijão não apresentavam qualquer sintoma de deficiência de nitrogênio, sendo encontrado nos nódulos a concentração de $1,84 \pm 0,2 \mu\text{g Mo.g nódulos secos}^{-1}$. Esta concentração está um pouco abaixo do nível crítico de Mo nos nódulos estabelecidos neste trabalho, provavelmente porque a adição do calcário também aumentou a liberação do nitrogênio do solo (29) tornando as plantas menos dependentes do nitrogênio atmosférico. Por outro lado em pH baixo (5,1), até a floração, as plantas não foram beneficiadas pela adição de altas concentrações de Mo (2,0 kg ha⁻¹) (7) indicando que nesta faixa de pH outros fatores limitaram a simbiose.

As condições artificiais usadas para o abaixamento do pH (tratamento pH 4,9) através da adição de ácido sulfúrico, que tem sido frequentemente utilizado em estudos de tamponamento de solos (23) deve ter provocado importantes modificações nas propriedades físicas, químicas e biológicas do solo. Conclusões, portanto, neste pH, devem ser tiradas com reservas. O suprimento de enxofre pode ter contribuído para a falta de resposta significativa na acumulação de nitrogênio nas plantas entre pH 4,9 e 5,5 no experimento II (Fig. 9). Entretanto apesar das dificuldades normalmente encontradas no estabelecimento de níveis críticos, principalmente de elementos como o Mo, necessários em pequenas quantidades (13) e cujas concentrações são alteradas com a idade da planta (16), algumas conclusões podem ser tiradas deste trabalho:

- Em condições de pouca disponibilidade de Mo no solo, as plantas acumularam mais Mo nos nódulos do que nas demais partes da planta
- No solo com pH mais baixo (4,9) o feijoeiro absorveu menos Mo que no pH mais alto (5,5).
- O nível crítico de Mo nos nódulos do feijoeiro no início da floração situou-se em torno de 3,66 $\mu\text{g Mo.g nódulos secos}^{-1}$.

LITERATURA CITADA

- 1 ANDERSON, A.J.; SPLNCR, D 1949. Molybdenum and sulphur in symbiotic nitrogen fixation Nature 164:273-274
2. BATAGLIA, O.C.; FURLANI, P.R.; VALADARES, J.M.A.S 1976. O molibdênio em solos do Estado de São Paulo. In Congresso Brasileiro de Ciência Do Solo 15, 1975, Campinas, Bra.) Anais. Campinas, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo p 107-111
- 3 CARVALHO, M.M. DE 1978. A comparative study of the responses of six stylosanthes species to acid soil factors with particular reference to aluminium. Tese Doutorado. University of Queensland. 287 p.
4. CLARKSON, D.T.; HANSON, J.B 1980 The mineral nutrition of higher plants Annual Review of Plant Physiology 31:239-298.
5. DE-POLLI, H.; SUHET, A.R.; FRANCO, A.A 1976 Micronutrientes limitando a fixação de nitrogênio atmosférico e produção de centrosema em solo Podzólico Vermelho-Amarelo. In Congresso Brasileiro de Ciência do Solo (15, 1975, Campinas, Bra.) Anais. Campinas, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo p 151-156
6. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA SERVIÇO NACIONAL DE LEVANTAMENTO E CONSERVAÇÃO DE SOLOS 1979 Manual de Métodos de Análise do Solo. Rio de Janeiro, Bra
- 7 FRANCO, A.A.; DAY, J.M. 1980. Effects of lime and molybdenum on nodulation and nitrogen fixation of *Phaseolus vulgaris* L. in acid soils of Brasil Turrialba (C.R.) 30(2):99-105
8. FRANCO, A.A.; MUNNS, D.N. 1981 Response of *Phaseolus vulgaris* L. to molybdenum under acid conditions. Soil Science Society of America Journal 45:1144-1148.
9. FRANCO, A.A.; MUNNS, D.N. 1982 Acidity and aluminum restraints of nodulation, nitrogen fixation and growth of *Phaseolus vulgaris* in solution culture. Soil Science Society of America Journal 46:296-301
- 10 GLADSTONES, J.S.; LONERAGAN, J.F.; GOODCHILD, N.A 1977. Field responses to cobalt and molybdenum by different legumes species with inferences on the role of cobalt in legume growth Australian Journal of Agricultural Research 28: 621-626
- 11 GRIGG, J.L 1953. Determination of the available molybdenum in soil New Zealand Journal of Science and Technology, Section A 34:405-414.
12. GUPTA, U.C.; KUNELIUS, H. 1980 Effect of molybdenum, lime and cropping on the yield and molybdenum concentration of grass-legume mixture and cabbage. Canadian Journal of Plant Science 60: 113-120.
- 13 GUPTA, U.C.; LIPSETT, J. 1981 Molybdenum in soils, plants and animals. Advances in Agronomy 34:73-115.
14. HAWES, R.L.; SIMS, J.L.; WELLS, K.L 1976. Molybdenum concentration of certain crop species as influenced by previous applications of molybdenum fertilizer. Agronomy Journal 68:217-218.
15. HUNGRIA, M. 1985. Fisiologia da fixação biológica do nitrogênio em *Phaseolus vulgaris* L. Tese Doutorado Rio de Janeiro, UFRRJ. 292 p.
- 16 JACOB-NLTO, J.; THOMAS, R.J.; FRANCO, A.A. 1988 Variação estacional da concentração de molibdênio nos nódulos e demais partes da planta de feijociro (*Phaseolus vulgaris* L.). Turrialba C.R. 38(1):51-58
- 17 JAMES, D.W.; JACKSON, I.L.; HARWARD, M.E. 1968. Effect of molybdenum and lime on the growth and molybdenum content of alfafa grown on acid soils. Soil Science 105:397-401
- 18 JOHNSON, C.M.; ULRICH, A. 1959. Analytical methods for use in plant analysis. California Agricultural Experiment Station Bulletin no. 766
19. JOHNSON, C.M 1973. Molybdenum In Diagnostic criteria for plants and soils. Ed by Chapman, H.D. California Riverside, University of California, Division of Agricultural Science p. 286-301
20. JOHASEN, C. 1978. Comparative molybdenum concentration in some tropical pasture legumes. Communications in Soil Science and Plant Analysis 9:1009-1017
21. LIAO, C.F.H 1981 Devarda's alloy method for total nitrogen determination. Soil Science Society of America Journal 45:852-855
22. LINDSAY, W.L. 1978. Chemical reaction affecting the availability of micronutrients in soils. In Mineral nutrition of legumes in tropical and subtropical soils. Ed by Andrew, C.S.; Kamprath, E.J. Australia, CSIRO p 153-163.
23. MAGDOFF, F.R.; BARTLETT, R.J. 1985. Soil pH buffering revised. Soil Science Society of America Journal 49:145-148.
24. MAGUE, T.H.; BURRIS, R.H 1972 Reduction of acetylene and nitrogen by field grown soybeans New Phytologist 71:275-276.
25. MINCHIN, F.R.; WITTY, J.F.; SHEENY, J.E.; MULLER, M.A. 1983 A major error in the acetylene reduction assay: decreases in nodular nitrogenase activity under assay conditions. Journal of Experimental Botany 34:641-649
26. MULDER, E.G 1954. Molybdenum in relation to growth of higher plants and microorganisms Plant and Soil 5:368-415
27. PARKER, M.B. HARRIS, H.B. 1977. Yield and leaf nitrogen of nodulating and nonnodulating soybeans as affected by nitrogen and molybdenum. Agronomy Journal 69:551-554

28. REISENAUER, H.M.; TABIKH, A.A.; STOUT, P.R. 1962. Molybdenum reactions with soils and the hydrous oxides of iron, aluminum and titanium. Soil Science Society of America. Proceedings 26: 23-27.
29. SAMARÃO, S.S.; DIDONET, A.D.; NEIVA, L.C.S.; DUQUE, F.F.; GOI, S.R.; JACOB-NETO, J.; MONTEIRO, P.M.F.O.; ROLIN, R.D. 1986. Influência da calagem e micronutrientes na nodulação da soja por *Rhizobium japonicum* em solos ácidos. Pesquisa Agropecuária Brasileira 21(3):237-244.
30. SHAH, V.K.; UGALDE, R.A.; IMPERIAL, J.; BRILL, U.J. 1984. Molybdenum in nitrogenase. Annual Review Biochemistry 53:231-257.
31. SIQUEIRA, C.; VELLOSO, A.C. 1978. Adsorção de molibdato em solos sob vegetação de cerrado. Revista Brasileira de Ciência do Solo 2:24-28.
32. VINCENT, J.M. 1970. Manual for the practical study of root-nodule bacteria. Oxford, IBP, Blackwell Scientific Publication. 164 p. (IBP Handbook no. 15).
33. WITTY, J.F.; MINCHIN, F.R.; SHEENY, J.E. 1983. Carbon costs of nitrogenase activity in legume root nodules determined using acetylene and oxygen. Journal of Experimental Botany 34:951-963.

Comparison of Two Breeding Methods in Corn. III. Yield of Selected Fourth-Cycle Lines from Each Population and Method¹

J.A. Morera*

ABSTRACT

To compare the two breeding methods, a mix of fourth-cycle lines from each population and method were tested at two locations. The overall yield performance was better with the S₂ progeny method than with the testcross method. These results suggest that the two methods emphasize different types of gene action and that overdominant gene action may exist at some loci.

COMPENDIO

Para comparar los dos métodos de mejoramiento, una mezcla de líneas seleccionadas del cuarto ciclo procedente de cada población y método fueron probadas en dos localidades. El comportamiento en rendimiento total fue mejor con el método de líneas autofecundadas que con el método de cruza de prueba. Esos resultados, sugieren que los dos métodos enfatizan diferentes tipos de acción de genes y que genes overdominantes pueden existir en algunos loci.

INTRODUCTION

The objective of this paper is to report additional information on the value of S₂ progeny selection in comparison with selection based on testcross performance. One method is based on performance of S₂ lines since selfed progeny evaluation avoids the masking effect of testers (resulting in

higher heritability estimates). The second method is based on the performance of testcrosses involving S₂ lines crossed with an inbred tester.

Reports from Genter and Alexander (2) and Burton *et al* (1) indicated that dominant genes of the tester may mask genetic differences between lines. S₁ line selection has been suggested to solve this difficulty. However, increases in the frequencies of favorable alleles at those loci affecting grain yield should be greater with S₂ selection than with S₁ line selection since, at $p = 0.5$, additive variance among S₂ lines is 1.5 times as large as among S₁ lines (3).

Horner *et al* (4) evaluated five cycles of recurrent selection using an inbred line and the parental popula-

¹ Received for publication 10 May 1988.

The present work is adapted from the author's Ph.D. thesis, supported by the German Academic Exchange Service. I wish to express my thanks to Dr. E.S. Horner, University of Florida, for encouragement and assistance, and to the Tropical Agricultural Research and Training Center (CATIE/GTZ) for granting the leave of absence required for the the program.

* Plant breeder, calles 7-9, Avenida O, Alajuela, Costa Rica.

tion as testers, and S_2 progeny performance. They reported a 4.4% yield gain per cycle from the inbred tester method compared with a 2.4% and 2.0% yield for the parental tester and S_2 progeny methods, respectively. They indicated that the inbred tester method was evidently more effective for improving breeding populations and developing elite single crosses. In a later experiment, using a different base population, Horner (5) reported no significant difference between methods for combining ability improvement. However, in the case of grain yield of inbred generations, S_2 selection was clearly superior to the test cross method. This was expected because, based on genetic theory (3), the S_2 progeny method places relatively more emphasis on contributions of homozygous loci than of heterozygous loci.

MATERIALS AND METHODS

To determine the effect of breeding methods on the vigor of selected inbred lines derived from fourth cycle populations, four composites were obtained by bulking equal amounts of seed from the selected fourth-cycle S_2 lines of each population and method. The four composites were evaluated in one-row plots in 1986 at two locations near Gainesville, Florida. A randomized complete block design with ten replications was used at each location. Row spacing was 91 cm and plant distance in the rows was 30.5 cm. Two seeds were planted per hill and the plants were thinned to one per hill when they had reached a height of 15 cm.

Data on grain yield per plot, ear height, husk score, and percentage of erect plants at harvest were taken prior to harvesting. The plots were harvested by hand, and the total number of ears and field weight per plot were registered. Representative ears from four replications were saved, dried, and shelled for dry matter calculations. The field weight of each plot was adjusted to Mg/ha shelled grain at 15% moisture and full stand. The analysis of variance was performed for adjusted grain yield, ear height, ears per plant, husk score, ear weight, and percentage of erect plants at harvest.

To estimate method and population effects, the sums of squares for composites were partitioned into sources of variation attributed to methods, populations, and the interaction between methods (M) and populations (P). Similarly, the sums of squares for composites (C) and locations (L) were partitioned into L x M, L x P, and (M x P) x L sources.

RESULTS AND DISCUSSION

Variation among the four composites was significant at the 0.01 probability level for all traits studied except erect plants (Table 1). Interaction between composites and locations was significant at the 0.01 level only for grain yield. There were statistically significant differences between methods for all traits analyzed except erect plants (Table 1). Populations were also significantly different at the 0.01 level for

Table 1. Mean squares from the analyses of variance for several traits for comparison of S_2 progeny and testcross methods of fourth-cycle populations.

Source of variation	df	Trait					
		Grain yield	Ear weight	Ear height	Ears/plant	Erect plant	Husk score [†]
		Mg/ha	g	cm	no	%	
Locations (L)	1	4.02**	1 757.81*	0.001	0.36*	0.10**	3.61
Reps/L	18	0.37	303.70	0.07	0.05	0.01	1.39
Composites (C)	3	3.60**	2 497.75**	0.50**	0.17**	0.02	10.75**
Methods (M)	1	6.11**	7 353.61**	0.70**	0.22**	0.02	15.31**
Populations (P)	1	1.67**	99.02	0.33*	0.25**	0.00	9.11*
M x P	1	3.03**	40.61	0.46*	0.04	0.04	7.82*
L x C	3	0.82**	68.21	0.06	0.02	0.03	0.81
L x M	1	0.00	0.61	0.01	0.00	0.00	0.01
L x P	1	2.46**	183.01	0.10	0.06	0.04	0.11
L x (M x P)	1	0.00	21.01	0.08	0.00	0.04	2.33
Error	54	0.13	121.44	0.08	0.02	0.01	1.48
Total	79						

*, ** Significant at the 0.05 and the 0.01 probability levels, respectively.

† Scores were on a 1 (good) to 9 (poor) scale.

Table 2. Mean performance for several traits of fourth-cycle lines selected by the S_2 progeny and testcross methods. Average for two locations (1986).

	Trait					
	Grain yield ¹	Ear weight	Ear height ²	Ears/100 plants	Erect plant ³	Husk score ⁴
	Mg/ha	g	cm	no	%	
Pop A:						
S_2	3.85 ⁺	116	83.4	159	92	6.0
TC	2.92	95	73.2	159	85	5.8
Pop B:						
S_2	3.00	117	82.5	140	91	6.0
TC	3.18	99	81.6	158	89	4.5
LSD (0.05)	0.23	7	3.8	11	ns	0.8

+ Each mean represents 20 observations

ns nonsignificant

1 Shelled grain at 15% H_2O in Mg/ha^{-1}

2 Measured in cm to the node of top ear attachment

3 Percentage of plants with stalks not broken below the ear at harvest

4 Scores were on a 1 (good) to 5 (poor) scale.

grain yield and number of ears per plant and at 0.05 level for ear height and husk score. No significant difference between populations was found for ear weight or erect plants at harvest. In populations A, the two methods were significantly different for yield, the S_2 progeny method being significantly superior at the 0.05 level; whereas in population B there was no significant difference for yield between the two methods (Tables 1 and 2). This resulted in a significant method/population interaction.

The S_2 progeny method resulted in significantly heavier ears in both populations than the testcross method (Table 2). The S_2 progeny method resulted in significantly higher ears in population A; whereas in population B there was no significant difference between the two methods. The number of ears per 100 plants was higher in population A than in population B. However, in population A no significant difference between the two methods was observed. In population B, the testcross method resulted in significantly more ears per 100 plants at the 0.05 level than the S_2 progeny method. The testcross method resulted in significantly better ($P < 0.05$) husk scores (low husk-cover scores are more desirable than high scores) than the S_2 progeny method in population B, but no significant difference was found in population A. The larger ears with the S_2 progeny method may have resulted in a shorter husk and, therefore, higher husk scores.

In summary, these data (Table 2) show that there was a trend for higher grain yield (population A), higher ear weight, taller (undesirable) ear height, same number of ears per 100 plants in population A but fewer in population B, more erect plants at harvest, and higher (poorer) husk score with the S_2 progeny method than with the testcross method.

Effect of methods on vigor of inbred lines derived from third (6) and fourth-cycle populations and on inbreeding depression have produced similar results. The second experiment showed that the S_2 progeny method was superior to the testcross method for grain yield of third-cycle populations in the S_1 and S_2 generations. The third experiment showed (Table 2) that the S_2 progeny method was superior to the testcross method for grain yield in population A; however, in population B no significant difference was detected. A possible explanation for the lack of difference between methods in population B is that a more intensive selection for agronomic type and vigor was necessary in this population than in population A, possibly because it contained more tall plants of poor agronomic type. This visual selection may have resulted in equal progress for both methods in population B. The overall yield performance (average of both populations and both experiments) was better with the S_2 progeny method than with the testcross method.

LITERATURE CITED

1. BURTON, J.W.; PENNY, L.H.; HALLAUER, A.R.; EBERHART, S.A. 1971. Evaluation of synthetic populations developed from a maize variety (BSK) by two methods of recurrent selection. *Crop Science* 11:361-365.
2. GENTER, C.F.; ALEXANDER, M.W. 1962. Comparative performance of S_1 progenies and testcrosses in corn. *Crop Science* 2:516-519.
3. HORNER, E.S.; CHAPMAN, W.H.; LUTRICK, M.C.; LUNDY, H.W. 1969. Comparison of selection based on yield of topcross progenies and of S_2 progenies in maize (*Zea mays* L.). *Crop Science* 9:539-543.
4. HORNER, E.S.; LUNDY, H.W.; LUTRICK, M.C.; CHAPMAN, W.H. 1973. Comparison of three methods of recurrent selection in maize. *Crop Science* 13:485-489.
5. HORNER, E.S. 1985. Effects of selection for S_1 progeny versus testcross performance in corn. In *Proc. 40th Ann. Corn and Sorghum Ind. Res. Conf.* (40, 1985, Chicago). Proceedings Washington, D.C., American Seed Trade Association p. 142-150.
6. MORERA, J.A. 1989. Comparison of two breeding methods in corn. II. Determination of inbreeding depression. *Turrialba* 39(1).

Comparison of Two Breeding Methods in Corn. IV. Correlation of Inbred Lines (S_2 Parents) and Testcross Performance¹ /

J.A. Morera*

ABSTRACT

The experiment reported in this paper was initiated to obtain information on the relative value of inbred line selection and selection based on testcross performance. To evaluate both methods, fourth cycle inbred lines (S_2 parents) and their testcrosses were tested in one and two locations, respectively, over one year. There was a significant positive correlation between the two evaluation methods for all traits studied, except ears per plant in population B. These results suggest that visual selection among lines in one environment may be effective for the elimination of undesirable traits in hybrids, especially for stalk strength, ear height and husk score.

INTRODUCTION

With the advent of single-cross corn hybrids, breeders have become interested in increasing the yield of parental line *per se* and the hybrids developed using these inbred lines.

¹ Received for publication 10 May 1988.

The present work is adapted from the author's Ph.D. thesis, supported by the German Academic Exchange Service. I wish to express my thanks to Dr. E.S. Horner, University of Florida, for encouragement and assistance, and to the Tropical Agricultural Research and Training Center (CATIE/GIZ) for granting the leave of absence required for the program.

* Plant breeder, calles 7-9, Avenida Central, Alajuela, Costa Rica, Central America.

COMPENDIO

El experimento reportado en este artículo fue iniciado para obtener respuesta sobre el valor relativo de selección de líneas *per se* y selección basada en los cruces de prueba. Para evaluar ambos métodos, líneas puras obtenidas del cuarto ciclo y sus respectivos híbridos fueron probados en una y dos localidades, respectivamente durante un año. Hubo una correlación significativa entre los dos métodos de evaluación para todos los tratamientos estudiados, a excepción de número de mazorcas por planta en la Población B. Esos resultados sugieren que selección visual entre líneas *per se* en un ambiente puede ser efectivo para la eliminación de características indeseables en los híbridos, especialmente para resistencia de tallo al acame, altura de mazorca y extensión de la tusa.

The first evaluation of S_1 and S_2 line selection was made by Davis (2) in which lines were selfed for two generations, then crossed with an unrelated open-pollinated variety tester. Davis found that the average yield of S_1 and S_2 lines was more reliable than that of testcrosses for selection.

Genter and Alexander (4) made comparative performance tests between S_1 lines selected on the basis of S_1 progeny yield and S_1 lines selected on the basis of testcross performance with single-cross testers. They reported more dispersed means (larger variance) and fewer environmental effects from S_1 progenies than from testcrosses. After two cycles of selection, Genter and Alexander (5) found that

inbred lines obtained from S_1 progeny population showed a yield increase of 31.4%. However, only a 17.9% yield increase was obtained using the testcross method with the parental population as the tester. The more productive S_1 lines tend to produce the more productive crosses, but the correlation between S_1 line and testcross yield decreased from 0.61% to 0.15% from the first to the second cycle of selection. Koble and Rinke (6) compared random S_1 progenies and testcrosses with related and unrelated population testers. They concluded that the S_1 selection method could replace the testcross selection method. Lonnquist and Castro (7) and Lonnquist and Lindsey (8) reported that the S_1 progeny method seems to be a more logical procedure in the preliminary selection of desirable parents than the testcross method with related and unrelated testers.

Clucas (1) evaluated 400 S_2 lines and their respective testcrosses in three environments in Iowa. He found that the mean grain yield and stand percentage of the visually selected lines were 169 kg/ha and 2.58% greater, respectively, than those of the randomly selected lines. No significant differences were observed between means of testcross progenies of visually and randomly selected lines. Correlations between S_1 lines traits and the same traits in testcrosses were 0.19, 0.59, 0.51, 0.48, and 0.29 for grain yield, grain moisture content, stalk lodging, root lodging, and vertical root-pull resistance, respectively. He concluded that selection for superior testcross performance based on S_2 performance *per se* is not practical.

MATERIALS AND METHODS

S_2 lines for the S_2 progeny method were obtained by saving only one selfed ear from each parental S_1 line. Two-hundred-seventy-eight inbred lines from populations A and B were grown in two replications at one location near Gainesville, Florida, in 1984. Row-to-row spacing was 91 cm and plant-to-plant distance in the row was 30.5 cm. About 15 plants per plot were maintained. Standard agronomic practices were used, including irrigation and insect control when needed. During the growing period stalk quality, ear height, husk score, and ears per plant were recorded for each line. Stalk quality and husk score were determined on a scale from one (best) to nine (worst). Ear height was measured from the ground to the node of attachment of the highest ear. The plots were hand harvested, and the lines were evaluated for ear quality on a scale from one to five.

In a parallel test, the same S_2 lines were evaluated for performance of their testcrosses using inbred testers. An S_3 line from population A was used as a

tester to evaluate lines from population B, and vice-versa. These testcrosses were evaluated at two locations near Gainesville, Florida, in 1984. About 25 plants were maintained per plot. A randomized complete block design (RCBD) with five replications at each location was used to evaluate testcross performance. A plot combine was used for harvest.

Correlations were calculated using entry means over two environments for the testcrosses and means from one environment for the S_2 lines. Simple correlation coefficients of the means for five traits observed were calculated to determine the relationship between S_2 parents and testcross traits.

Table 1. Simple correlation coefficients between S_2 lines and testcross performance for five traits in 1984.

Trait	Population	
	A	B
Stalk quality	0.36**	0.51**
Ear height	0.57**	0.42**
Husk score	0.58**	0.62**
Ear quality	0.20**	0.17**
Ears per plant	0.30**	0.10ns

** Significantly larger than zero at the 0.01 level (276 df)
ns = not significant

RESULTS AND DISCUSSION

Simple correlation coefficients for five traits observed in the screening tests are given in Table 1.

Inbred line and testcross performances were positively correlated for all traits studied, except ears per plant in population B. Even though the two methods were positively correlated, however, the R^2 values were small. The highest R^2 was equal to 0.38 for the correlation of husk score in S_2 lines and testcrosses in population B. The simple correlation between S_2 and testcross ear height was significantly larger for population A ($r = 0.57$) than population B ($r = 0.42$). Conversely, for stalk quality in population B, the correlation between S_2 lines and their testcrosses ($r = 0.51$) was significantly greater than that of population A ($r = 0.36$). Correlations between S_2 and testcross husk score entry means were the largest of any calculated ($r = 0.58$ and $r = 0.62$) for populations A and B, respectively. However, for ear quality, and particularly for ears per plant, correlations of performance between S_2 lines and testcrosses seemed of little value. These results, which are similar to those reported by Clucas (1), indicate that visual selection among lines in one environment may be effective for the elimination of undesirable traits in hybrids,

especially for stalk strength, ear height and husk score. However, these results are in disagreement with those of Gama *et al.* (3), who found very low correlations for plant and ear traits between S_7 lines from BSSS and their single cross hybrids. Perhaps such highly homozygous lines (S_7) are more subject to genotype by environment interaction than S_1 or S_2 lines.

The response of selection for number of ears per plant in population B was not as good as expected.

This population was noticeably poorer in appearance of S_1 and S_2 lines than population A. More visual selection among lines of good agronomic type has been carried out in population B than in population A during the inbreeding and preparation of hybrid phases. This selection may have produced a shift in gene frequencies of loci favorable for ear number in the negative direction. Another possible explanation is that inbred tester A may have carried dominant genes which masked the genotypes of B lines.

LITERATURE CITED

1. CLUCAS, C.P. 1985. Effects of visual selection among and within lines of maize on S_2 line and testcross performance. Ph.D. Dissertation. Ames, Iowa State University.
2. DAVIS, R.L. 1934. Maize crossing values in second-generation lines. *Journal of Agriculture Research* 48:339-357.
3. GAMA, E. ELIO, E.G.; HALLAUER, A.R. 1977. Relation between inbred and hybrid traits in maize. *Crop Science* 17:703-706.
4. CENTER, C.F.; ALEXANDER, M.W. 1962. Comparative performance of S_1 progenies and testcrosses in corn. *Crop Science* 2:516-519.
5. CENTER, C.F.; ALEXANDER, M.W. 1966. Development and selection of productive S_1 inbred lines of corn (*Zea mays* L.). *Crop Science* 6:429-431.
6. KOBLE, A.F.; RINKE, E.H. 1963. Comparative S_1 line and topcross performance in maize. In *Agron. Abstr. Annual Meeting* (55, 1963, Denver, CO) Madison, Wisc. American Society of Agronomy. p.83.
7. LONNQUIST, J.H.; CASTRO, M.G. 1967. Relation of intrapopulation genetic effects to performance of S_1 lines of maize. *Crop Science* 7:361-364.
8. LONNQUIST, J.H.; LINDSLY, M.F. 1964. Topcross versus S_1 line performance in corn (*Zea mays* L.). *Crop Science* 4:580-584.

Burn Quality Prediction for Simulation of the Agricultural System of Brazil's Transamazon Highway Colonists¹

*P M Fearnside**

ABSTRACT

High variability in burn quality of agricultural fields is critical for crop yields among pioneer settlers occupying 100 ha lots in Brazil's Transamazon Highway Colonization area near Altamira, Pará. Prediction of burn qualities, using clearing and burning dates and weather information, is part of a larger simulation of the colonists' agroecosystem for estimating human carrying capacity. Colonist pioneer agriculture has been largely based on annual crops such as upland rice, maize, beans, cowpeas, and manioc; perennial crops and pasture are now increasing. Burn qualities of both second growth (at least eight months uncultivated) and "virgin" forest (uncleared by recent Luso-Brazilian colonists) are predicted using discriminant analysis from precipitation, evaporation, and insolation between cutting and burning, and from precipitation in the 15 days prior to burning. Simulations use two burn categories: good and bad, condensed from a more complete 4-level taxonomy. Virgin burn prediction discriminant function correctly classifies 74% of 247 cases; second growth discriminant function correctly classifies 65% of 54 cases. Weather patterns, also modeled on carrying capacity simulations, are highly unpredictable, making good burns a major agricultural problem and an important factor affecting human carrying capacity.

INTRODUCTION

In most studies of shifting cultivation systems, or other similar agricultural systems in tropical rainforest areas also characterized by the "slash-and-burn" feature of traditional shifting cultivation, the assumption is made that crop yields are constant from one year to the next. High variability in crop yields, as in the pioneer agriculture practiced by colonists settled along Brazil's Transamazon Highway, is itself a vital feature of this form of agriculture as a means of supporting human populations. Estimates of human carrying capacity based on the various forms of the "shifting cultivation formula," for

RESUMO

A alta variabilidade na qualidade da queimada de roças é crítica para produções das culturas entre colonos pioneiros localizados em lotes de 100 hectares na área de colonização da rodovia Transamazônica perto de Altamira, Pará, Brasil. Predição de qualidades de queimadas, baseada nas datas de derrubada ou roçagem e de queimada, e em dados meteorológicos, forma parte de uma simulação maior do agro-ecossistema dos colonos para a estimativa de capacidade de suporte humano e, em particular, para avaliar a importância da variabilidade em produções das culturas sobre a capacidade de suporte. A agricultura pioneira dos colonos tem sido baseada, em grande parte, em culturas anuais, tais como arroz de sequeiro, milho, feijão do sul, feijão da corda e mandioca. As culturas perenes e pastagens estão aumentando atualmente. As qualidades de queimada tanto de capoeira (pelo menos 8 meses sem cultivo) quanto de floresta "virgem" (não derrubada por colonos luso-brasileiros recentes) são predizíveis usando análise discriminante a partir de precipitação, evaporação e insolação entre o corte e a queimada, e a partir da precipitação nos 15 dias anteriores à queimada. As simulações utilizam duas qualidades de queimada: boa e ruim, resumidas de uma taxonomia de queimadas mais completa com quatro níveis. A função discriminante para predição de queimadas virgens classifica corretamente 74% de 247 casos; a função para capoeira classifica corretamente 65% dos 54 casos. Os padrões meteorológicos, também modelados nas simulações de capacidade de suporte, são bastante imprevisíveis, fazendo com que queimadas ruins sejam um grande problema agrícola e um fator influente sobre a capacidade de suporte humano.

example, generally ignored yield variability (1, 5, 7, 20), although allowance of additional crop area allocations as a safeguard against lean years is possible (2). Assessment of the effect of variability on human carrying capacity in the Transamazon Highway area required deriving quantitative relationships for modeling the causes of variation in crop yields, and incorporating these features into computer simulation models of the colonists' agroecosystem (8, 9, 15, 16).

The importance of burn quality as a factor affecting colonist agricultural production quickly became evident during two years of residence in the Altamira colonization area. Differences in crop growth and yield between fields with good and poor burns, or between small patches with better or poorer burns within a single field, are readily apparent. On the scale of the Altamira colonization area as a whole, rain during the normally dry July-September period in 1973 resulted in many colonists failing to obtain adequate burns, with the consequence that in 1974 they were either unable to plant or had a meager harvest which may also have been on a reduced area.

¹ Received for publication 14 June 1988.

Funds for the project, of which this paper is a part, came from National Science Foundation dissertation improvement grant GS-42869, a Resources for the Future predoctoral fellowship, two fellowships from the Institute for Environmental Quality, the University of Michigan, and the Programa do Trópico Úmido of the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. I thank the Ford Foundation for travel funds to allow presentation of these results at the International Society for Tropical Ecology (ISTE) symposium on "Ecology and Resources Management in the Tropics," Bhopal, India, 5-10 October 1981. I thank ISTE for permission to publish these results, which will appear in the symposium proceedings (17). None of the views expressed are the responsibility of the organizations which have supported the project.

* Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, Caixa Postal 478 69 011 Manaus - Amazonas Brazil.

A good burn is necessary in order to remove the physical encumbrance of cut vegetation, to reduce losses to pests and weeds, and especially to increase soil fertility, and particularly to raise pH with a consequent reduction of toxic aluminum ion concentration and an increase in the abundance and availability of phosphorus. A survey of soils under "virgin" forest (uncleared by recent Luso-Brazilian colonists, as distinguished from possible past use by Amerindian groups) indicates that 78.5% of the area has a pH of less than 5.0 and 33.0% has a pH of less than 4.0, while 83.8% has total phosphorus of less than 1 ppm (12).

In most other parts of the world where existing studies of shifting or similar cultivation systems have been undertaken, virgin soil pH and associated characters are substantially more favorable for agriculture than is the case in the Brazilian Amazon. Soils are better in this respect, for example, in the sites of shifting cultivation studies in various locations in Africa (22), Central America (24, 25), Sri Lanka (21), and New Guinea (4). In many African soils, burning has deleterious effects by raising pH levels sufficiently high that associated decreases in soil iron concentrations result in iron deficiencies (29). Although many accounts of shifting cultivation systems make no mention of variable burn quality as a problem, poor burns are of major importance in some areas (19).

Normal burning in Amazon soils is beneficial, although occasionally a burn is so intense that large logs are completely reduced to ashes, resulting in stunted crop growth in the places where the logs have burned. Later succession on an overburned site is also deflected, sometimes resulting in patches of ferns rather than woody second growth.

Little information exists on variability in burn quality, or the effects of this feature on shifting and pioneer cultivation systems. Nye and Greenland's (22) classic literature review on shifting cultivation mentions that "the thoroughness with which the burn is carried out will also determine to some extent the qualities of nutrients added to the soil," but located no data to quantify differences. Sánchez' (28) review states simply: "the intensity of the burn is no doubt a major variable (for soils nutrient additions). Unfortunately no data are available on this aspect."

The effect of burn quality on soil fertility changes has been incorporated into simulation programs for the Transamazon Highway agroecosystem. Burn qualities enter regressions for predicting fertility changes under burning as dummy variables (16). Predicting burn qualities from weather data and from

information on clearing and burning behavior of colonists is necessary to provide inputs for these soil fertility change calculations.

Study Area

The study was conducted in a 23 600 ha area of 100 ha colonist lots in the Altamira Integrated Colonization Project (PIC-ALTAMIRA), in the Altamira-Itaituba stretch of the Transamazon Highway (BR-320). The study area is centered on Agrovila Grande Esperança, 50 km west of the town of Altamira, at latitude 3° 22" south, longitude, 52° 38" west. The area is in the Município of Prainha, State of Pará, Brazil, with an altitude of approximately 100 meters above sea level. The climate is classified as Aw in the Köppen system (23), with a 36-year average annual rainfall of 1.7 m (6). Precipitation is highly variable from one year to the next both in quantity and timing (13). Most soils are poor red-yellow podzolics (Ultisols), but there are some patches of much better terra roxa (Alfisol). Colonists cut and burn virgin forest in a manner similar to that under traditional shifting cultivation, and clear second growth of all ages. They do not leave land fallow for long periods with the intention of continuing future cycles of annual crops alternating with fallow as a long term land use practice (14).

METHODS

Data on precipitation come from the Brazilian Agricultural Research Agency (EMBRAPA) experiment station located 23 km west of Altamira (27 km east of the study site), with the exception of a few days of missing information for which data were used from the Meteorology Department weather station in Altamira. Information on insolation and evaporation comes from the Altamira station. A series of Fortran programs made a variety of preliminary calculations, including totals of rainfall and other measures between clearing and burning dates.

Burn qualities and clearing and burning dates were obtained from the colonists through questionnaires applied in association with soil samples. Any information relative to burn quality observable in the field at the time of sampling was also recorded. Questionnaires used in the study were applied between June 1974 and August 1976, but colonist responses include information on burns beginning with the start of settlement in the area in 1971. Colonists' memory of this information in these early years of colonization was quite good. Regular visits to the study area between 1978 and 1987 have confirmed that the observed pattern of variable burn quality continues.

Table 1. Burn quality classification for virgin burns.

Burn quality	Definition
none	No burn was attempted (therefore no date for burning).
0	Burn attempted (therefore with burning date) but did not burn. There may be some blackened bark and burned leaves, but the ground remains "raw". Usually the colonist cannot plant. "Nao queimou".
1	Bad burn. Only leaves and small twigs burned. Only maize can be planted without a great deal of <i>coivara</i> (piling up unburned material to clear land for planting) " <i>Queimou ruim. Sapecou as folhas</i> ".
2	Patchy burn. A mixture of class 1 and 3 patches where fire burned with varying intensity. Can be planted with <i>coivara</i> " <i>Mais ou menos queimou. Queimou variado</i> ".
3	Good burn. Burned wood as well as twigs and leaves, although larger logs are invariably only partly burned. Can be planted with rice with no or very little <i>coivara</i> " <i>Queimou bem</i> ".
4	Overburned. Large logs burned completely to ashes. This "burns the earth" and results in stunted crops " <i>Queimou até que queimou a terra</i> ".

Interviews with older residents in the traditional farming area near Altamira reveal a similar pattern dating back to the 1930s.

Burn qualities were classified by type and quality. Burn types were virgin forest, second growth or *capoeira* (defined as at least eight months uncultivated), weeds or *palhada* (defined as between two and eight months uncultivated), and pasture. Burn qualities were divided into six levels, including two non-burned categories (Table 1). In data analysis and simulation these burn qualities were condensed into two categories: "bad" (classes 0 and 1) and "good" (classes 2 and 3).

Data were analyzed using discriminant analysis (26), with the Michigan Interactive Data Analysis System (18). Subsequent modeling uses the KPROG2 program for human carrying capacity estimation (9).

RESULTS AND DISCUSSION

Virgin Forest Burns

Burn qualities in fields felled from virgin forest can be predicted based on weather between felling and burning dates. Months of felling are given in Table 2, together with the distribution of days between felling and burning.

In simulation, burn qualities can be predicted using simulated weather data for the Altamira area, and Fisher's discriminant functions for "good" burns (qualities 2-3 of Table 1) and "bad" burns (qualities 0-1). The discriminant analysis with the two equations is shown in Table 3. If, when appropriate weather values are substituted in these two equations the "good" burn equation gives a greater value than the "bad" equation, then a good burn is

Table 2. Virgin forest felling, monthly distribution.

Item	May	June	July	August	September	October	November	December	Total
Number	1.0	2.0	16.0	31.0	180.0	82.0	37.0	14.0	363
%	0.3	0.6	4.4	8.5	49.5	22.6	10.2	3.9	100

Mean days between felling and burning = 44.1 (SD = 65.3, N = 138).

Table 3. Virgin burn quality prediction discriminant analysis.

Variable	Coefficients	
	Bad burn	Good burn
Constant:	-6 1617	-7 5752
Rain between felling and burning (mm)	0 0032459	0 0012662
Evaporation between felling and burning (mm)	-0 0035933	-0 000052735
Insolation between felling and burning (hours)	0 0034928	0 0025793
Rain in 15 days previous to burn (mm)	0 076949	0 088626
Evaporation in 15 days previous to burn (mm)	0 15809	0 01827
Insolation in 15 days previous to burn (mm)	0 038381	0 031593
General variances	2.43×10^{22}	2.26×10^{20}
Sample sizes	76	171

Equality of covariances: $df = 21$, 83234 $F = 22.47$
Mahalanobis distance: $D^2 = 0.686$
 F statistic = 5.89
Significance < 0.0001 in both

predicted. This correctly predicts burn quality in 74% of the cases (Table 4). In the remaining 26% of the cases the opposite burn quality occurs.

Second Growth Burns

Burns in fields in second growth can be predicted in a way similar to that used for virgin burns. Distributions of cutting and burning dates are given in Table 5, together with the distribution of days between cutting and burning.

Discriminant functions for "good" (class 2 and 3) and "bad" (class 0 and 1) second growth burns are given in Table 6. These equations correctly predict 65% of 54 cases of second growth burns. As with

virgin burns, the remaining fraction of cases is predicted incorrectly. In simulating this process, randomly selected cases—in the proportion each outcome is predicted incorrectly—are assigned to the opposite burn quality (Table 7).

Although a substantial part of the variability in burn quality is explainable in terms of the meteorological variables used in this analysis, much variability remains unexplained. Weather information from a location closer to the fields studied would undoubtedly improve burn quality predictions, since precipitation and other characters are quite patchy in the area. Unfortunately, the disappearance of a shipment of rain gauges made this impossible in the present study. Information on additional weather

Table 4. Observed and predicted virgin burn qualities.

Predicted burn quality	Observed burn quality		Total
	Bad ¹	Good ²	
Bad ¹	15 (83.3%)	3 (16.7%)	18 (100%)
Good ²	61 (26.6%)	168 (73.4%)	229 (100%)
Totals	76	171	247

Number correctly predicted is 183 of 247 cases or 74%.

1 "Bad" burns are lumped class 0 and 1 virgin burns

2 "Good" burns are lumped class 2 and 3 virgin burns

Table 5. Second growth cutting and burning monthly distributions.

Item	Month								Total
	Jun.	Jul.	Aug.	Sept.	Oct.	Nov.	Dec.	Jan.	
Cutting									
Number	1	8	8	39	24	20	10	1	111
%	0.9	7.2	7.2	35.1	21.6	18.0	9.0	0.9	100
Burning									
Number	0	0	4	10	50	37	13	5	119
%	0	0	3.4	8.4	42.0	31.1	10.9	4.2	100

Mean days between cutting and burning = 52.6 (S.D. = 96.1 N = 79)

characters, such as wind speed, might also be helpful, but obtaining more localized information, especially on precipitation, is a higher priority. The three characters used (precipitation, evaporation, and insolation) are highly intercorrelated. Although all contribute to the prediction information specific to the field's location for a single easily-measured variable, such as rainfall, might produce better results than more complete information from a more distant weather station.

Many other factors contribute to variability in burn quality. The strength and direction of the wind at the time of burning appear to be important, as does the size of the clearing, large clearings burning better than small ones. In most cases a colonist must burn all of his clearing in a given year at the same

time, in order to maximize the area being burned and thus minimize the chance of fire inadvertently entering areas that have been cut but are not yet ready for burning (thus making proper burning virtually impossible later). The result is that colonists wait as long as they dare prior to the onset of the rainy season before burning, so that as large an area as possible can be cleared in the time available. The institutional complication of bank loans for clearing usually not being liberated until after the proper time for clearing has passed, also contributes to the tendency to burn late in the season. Since the area's rainy season does not begin on an accurately predictable date, in contrast, for example, with many Asian monsoon climates, colonists frequently wait until optimal burning time has passed. Colonists must wait long enough after clearing before burning in

Table 6. Second growth burn quality prediction discriminant analysis.

Variable	Coefficients	
	Bad burn	Good burn
Constant:	-0.32692	-1.0033
Rain between cutting and burning (mm)	0.00048378	-0.0033761
Evaporation between cutting and burning (mm)	-0.013939	-0.020641
Insolation between cutting and burning (hours)	0.0029030	0.00060930
General variances	8.92×10^{11}	1.29×10^{13}
Sample sizes	31	23
Equality of covariances:	df = 6, 15499 F = 5.78 Significance < 0.0001	
Mahalanobis distance:	D ² = 0.566	
	F statistic = 2.39	
	Significance = 0.0793	

Table 7. Observed and predicted second growth burn qualities.

Predicted burn quality	Observed burn quality		Total
	Bad ¹	Good ²	
Bad ¹	26 (65.0%)	14 (35.0%)	40 (100%)
Good ²	5 (35.7%)	9 (64.3%)	14 (100%)
Totals	31	23	54

Number correctly predicted is 35 of 54 cases or 65%

- 1 "Bad" burns are lumped class 0 and 1 second growth burns.
- 2 "Good" burns are lumped class 2 and 3 second growth burns.

order to allow vegetation to dry. At the same time, a limit to the time one can wait is imposed by leaves falling off felled trees, rendering proper burning more difficult if delayed too long. The skill of the colonist in timing and executing the burn can be important. Better burns are obtained by felling in a circular pattern, so that the edges of the clearing have dried the longest and the fire converges on the center where vegetation is greenest.

Size of trees, especially in second growth, may be important, but attempts to quantify these effects have so far proved unsuccessful. Differences do exist between burns of "second growth" (at least eight months old) and "weeds" (between two and eight months old). Weed burn quality can be predicted from a similar discriminant analysis, but the weed burn quality prediction subroutine was removed from the carrying capacity simulation program when additional soil data revealed that burn quality ceased to have a significant effect on soil fertility changes in the case of weed burns. Burning of weeds, which occurred in 27.1% of 48 cases, has a significant effect on soils as compared with unburned cases (16). Pasture burns are not explicitly modeled, but regular burning of pastures at 2-3 year intervals is implied in soil changes occurring under pasture in the region (11).

LITERATURE CITED

1. ALLAN, W. 1949. Studies in African land usage in Northern Rhodesia. Rhodes Livingstone Papers no. 15.
2. ALLAN, W. 1965. The African husbandman. New York, Barnes and Noble. 505 p.
3. CARNEIRO, R.L. 1960. Slash-and-burn agriculture: a closer look at its implications for settlement patterns. In Men and cultures: selected papers of the fifth international congress of anthropological and ethnological sciences. Ed. by A.F.C. Wallace. (1956, Philadelphia), Philadelphia, University of Pennsylvania Press. p. 229-234.

The importance of crop yield variability for human carrying capacity makes the effect of variable burn quality a key factor in the colonists' agroecosystem, so far largely based on annual crops. To the extent that current trends are leading to replacement of annual cash crops with pasture and perennial crops in the area (10), burn quality will have a lesser role in the future. Annual crops for subsistence plantings in the Transamazon Highway area, and the annual cropping characterizing pioneer farming in the rapidly expanding agricultural frontier throughout Amazonia, insure that variable burn quality will continue to be a major preoccupation of farmers in these areas.

CONCLUSIONS

Burn quality in agricultural fields cleared from virgin forest and second growth can be simulated from information on clearing behavior and weather.

Burn quality represents an important link between highly variable weather patterns in the Transamazon Highway area and the great variability noted in crop yield obtained by colonists. These variable yields, in turn, have shown themselves to affect the area's carrying capacity for human populations.

- 4 CLARKE, W.C. 1971. Place and people: an ecology of a New Guinea community. Canberra, Australian National University Press. 265 p.
- 5 CONKLIN, H.C. 1959. Population-land balance under systems of tropical forest agriculture. Proceedings of the Ninth Pacific Science Congress (Bangkok) 7:63
- 6 FALESI, I.C. 1972. Solos da Rodovia Transamazônica. Belem, Brazil, Instituto de Pesquisas Agropecuárias do Norte. Boletim Técnico no. 55. 196 p.
- 7 FEARNSIDE, P.M. 1972. An estimate of carrying capacity of the Osa Peninsula for human populations supported on a shifting agriculture technology. In Report of research activities undertaken during the summer of 1972. Ed. by Organization for Tropical Studies. San José, C.R. p.486-529
- 8 FEARNSIDE, P.M. 1978. Estimation of carrying capacity for human populations in a part of the Transamazon highway colonization area of Brazil. Ph.D. Dissertation. Ann Arbor, University of Michigan. 624 p.
- 9 FEARNSIDE, P.M. 1979. The simulation of carrying capacity for human agricultural populations in the humid tropics: program and documentation. Manaus, Bra., Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. 546 p.
- 10 FEARNSIDE, P.M. 1980a. Land use allocation of the Transamazon Highway colonists of Brazil and its relation to human carrying capacity. In Land, People and Planning in Contemporary Amazonia. Ed. by Barbira-Scazzocelino, F. Cambridge University, England, Cambridge. Centre of Latin American Studies Occasional Paper no. 3. 313 p.
- 11 FEARNSIDE, P.M. 1980b. The effects of cattle pastures on soil fertility in the Brazilian Amazon: consequences for beef production sustainability. *Tropical Ecology* 21(1):125-137.
- 12 FEARNSIDE, P.M. 1984a. Initial soil quality conditions on the Transamazon Highway and their simulation in models for estimating human carrying capacity. *Tropical Ecology* 25(1):1-21.
- 13 FEARNSIDE, P.M. 1984b. Simulation of meteorological parameters for estimating human carrying capacity in Brazil's Transamazon Highway colonization area. *Tropical Ecology* 25(1):134-142.
- 14 FEARNSIDE, P.M. 1984c. Land clearing behaviour in small farmer settlement schemes in the Brazilian Amazon and its relation to human carrying capacity. In *Tropical Rain Forest: The Leeds Symposium*. Ed. by A.C. Chadwick. S.L. Sutton. Leeds, U.K. Leeds Philosophical and Literacy Society. 335 p.
- 15 FEARNSIDE, P.M. 1985. A stochastic model for estimating human carrying capacity in Brazil's Transamazon Highway colonization area. *Human Ecology* 13(3):331-369
- 16 FEARNSIDE, P.M. 1986. Human carrying capacity of the Brazilian rainforest. New York, Columbia University Press. 293 p.
- 17 FEARNSIDE, P.M. Burn quality prediction for simulation of the agricultural system of Brazil's Transamazon Highway colonists for estimating human carrying capacity. In *Ecology and Resource Management in the Tropics*. Ed. by K.C. Misra, H.N. Pandey, S.R. Govil. Varanasi, India. Bhargava Book Depot. v. 2. (In press)
- 18 FOX, D.J.; GUIRE, K.W. 1976. Documentation for MIDAS. Ann Arbor, University of Michigan Statistical Research Laboratory. 203 p.
- 19 FREEMAN, J.D. 1955. Iban agriculture, a report on the shifting cultivation of hill rice by the Iban of Sarawak. London, England. Colonial Research Studies. v. 18, 148 p.
- 20 GOUROU, P. 1966. The tropical world: Its social and economic conditions and its future status, 4 ed. New York, Longman. 196 p.
- 21 JOACHIM, A.W.R.; KANDIAH, S. 1948. The effect of shifting (Chena) cultivation and subsequent regeneration of vegetation on soil composition and structure. *Tropical Agriculturalist* 104:3-11.
- 22 NYE, P.H.; GREENLAND, D.J. 1960. The soil under shifting cultivation. Harpenden, U.K. Commonwealth Agricultural Bureaux of Soils, Technical Communication no. 51. 156 p.
- 23 PEREIRA, F.B.; RODRIGUES, J. de S. 1971. Possibilidades agro-climáticas do Município de Altamira (Pará). Departamento de Assuntos Universitários Belém, Brazil, Escola de Agronomia da Amazônia. Boletim no. 1. 46 p.
- 24 POPENOE, H. 1959. The influence of the shifting cultivation cycle on soil properties in Central America. Proceedings of the Ninth Pacific Science Congress (Bangkok) 7:72-77.
- 25 POPENOE, H. 1960. Effects of shifting cultivation on natural soil constituents in Central America. Ph.D. Dissertation in Agronomy. Gainesville, University of Florida. 154 p.
- 26 RAO, C.R. 1973. Linear statistical inference and its applications. 2 ed. New York, John Wiley.
- 27 RAPPAPORT, R.A. 1968. Pigs for the ancestors: ritual in the ecology of a new Guinea people. New Haven, Connecticut, Yale University Press. 311 p.
- 28 SANCHEZ, P.A. 1976. Properties and management of soils in the tropics. New York, John Wiley. 618 p.
- 29 SANCHEZ, P.A.; BUOL, S.W. 1975. Soils of the tropics and the world food crisis. *Science* 188:598-603.

Seleção de Estirpes de *Rhizobium* para o Feijoeiro. I — Precocidade para Nodulação e Fixação do Nitrogênio¹

C. A. Barradas*, M. Hungria**

ABSTRACT

In common beans (*Phaseolus vulgaris* L.), there is a period of N stress, between 15 and 22 days after emergence (DAE), due to a lack of synchronization between the depletion of N in the cotyledons and the beginning of nitrogen fixation. In three experiments performed under glasshouse conditions, 24 *Rhizobium* strains were examined for precocity of nodulation and N₂ fixation. Plants were harvested between 16 and 31 DAE. The strains H-20, H-24, H-37 and H-41 (from EMBRAPA-CPAC) and CNPAF 111, 112, 119, 233 and 234 (EMBRAPA-CNPAF) were the earliest to nodulate, showing differences in total N accumulation in tissues at 16 DAE. These strains also showed, since the first harvest, a pink internal nodule colour, higher nitrogenase activity, less electron loss via H₂ evolution, a higher ureide concentration in the xylem sap and a higher transport of total N in the xylem. Nitrogen accumulated in the nodules during this critical period of N stress, probably showing a deficient translocation of this element. Results showed that it is possible to select *Rhizobium* strains that avoid the initial classical symptoms of N deficiency in nodulated beans.

INTRODUÇÃO

O potencial para a obtenção de grandes produções de grãos baseadas na nodulação efetiva e na fixação biológica do nitrogênio eficiente e prolongada existe para a maioria das leguminosas. No caso do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), porém, embora seja uma das leguminosas mais utilizadas na alimentação brasileira, os programas de melhoramento até recentemente conduzidos não consideraram a capacidade dessa planta de fixar nitrogênio. Esse enfoque deveu-se às suposições iniciais de que o feijoeiro

RESUMO

Em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) nodulado tem-se observado um período de deficiência de N, entre os 15 e os 22 dias após a emergência (DAE), que ocorre devido à falta de sincronização entre o esgotamento de N dos cotilédones e o início da fixação do N₂. Em três experimentos conduzidos sob condições de casa-de-vegetação procurou-se identificar, entre 24 estirpes de *Rhizobium*, as mais precoces para nodulação e fixação do N₂. As coletas foram realizadas entre os 16 e os 31 DAE. As estirpes H-20, H-24, H-37 e H-41 (provenientes da EMBRAPA-CPAC) e as CNPAF 111, 112, 119, 233 e 234 (EMBRAPA-CNPAF) foram bastante precoces, apresentando diferenças no N total acumulado nos tecidos já aos 16 DAE. Essas estirpes se caracterizaram por apresentar, desde a primeira coleta, coloração interna rósea nos nódulos, maior atividade da nitrogenase, pequena perda de elétrons pela evolução do H₂, maior concentração de ureídeos na seiva do xilema e maior transporte de N total no xilema. Observou-se que ocorre um acúmulo de N nos nódulos durante esse período crítico de estresse de N, provavelmente indicando a deficiência de translocação desse elemento. Os resultados mostraram que é possível selecionar estirpes de *Rhizobium* que consigam evitar os sintomas iniciais clássicos de deficiência de N em feijoeiro nodulado.

apresentaria uma baixa capacidade de fixação do N₂, relacionada com o ciclo curto da cultura, sua sensibilidade aos fatores ambientais (3), pequena porcentagem de células infectadas nos nódulos (21), causando uma baixa atividade específica (8), e a queda abrupta de fixação logo após o florescimento (23).

Estudos mais recentes, porém, têm mostrado que o feijoeiro nodulado pode acumular altos teores de N, às vezes semelhantes aos das plantas recebendo N mineral (6, 12, 16), desde que sejam utilizadas cultivares e estirpes de *Rhizobium* adequadas e condições ambientais favoráveis. O estudo dos fatores ambientais e intrínsecos à simbiose que limitam a maximização da fixação biológica do N₂ nessa cultura é, portanto, de grande relevância, devido à utilização extensiva dessa leguminosa na América Latina.

Um dos fatores limitantes está na constatação de um período inicial de estresse de N em feijoeiro nodulado, que ocorre devido à falta de sincronização entre o esgotamento das reservas de N dos cotilédones da planta hospedeira e o início da fixação e exportação

¹ Recebido para publicação em 14 junho 1988

Agradecimentos a bióloga Lúcia Helena Boddey, pelo auxílio na condução dos experimentos. Ao CNPq, pela bolsa concedida à C. A. A. Barradas e à FINIP, pelo financiamento parcial desta pesquisa. Gostaríamos de agradecer também à Srta. Miriam pela datilografia do trabalho e ao Sr. Jair pelas ilustrações.

* Eng. Agrônomo, Bolsista do CNPq

** Eng. Agra., Dra. EMBRAPA, Unidade de Apoio ao Programa Nacional de Pesquisa em Biologia do Solo (UAPNPBS, Km 47 Cep 23851, Rio de Janeiro)

do N₂ fixado pelos nódulos (5, 7, 9). Devido ao ciclo curto da cultura, esse período pode afetar diretamente o crescimento e a produtividade das plantas. Consequentemente, tem sido recomendada, muitas vezes uma dose de arranque de fertilizante nitrogenado, que pode apresentar efeitos benéficos para o crescimento das plantas (17) e até estimular o crescimento dos nódulos (1). Mas o feijoeiro é considerado como extremamente sensível ao N mineral, que geralmente prejudica a nodulação e atividade da nitrogenase (4, 11, 12).

Por isso, neste trabalho, procurou-se investigar a capacidade de diferentes estirpes de *Rhizobium* de apresentarem nodulação e fixação do N₂ precoces, bem como identificar alguns parâmetros fisiológicos relacionados com a fase inicial de fixação do N₂ no feijoeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos três experimentos sob condições de casa-de-vegetação na EMBRAPA-UAPNPBS, Km 47, Rio de Janeiro, no período de outubro de 1986 a julho de 1987.

Utilizaram-se sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Negro Argel, que tem sido reconhecida como responsiva à fixação do N₂ (10). Foram utilizadas 24 estirpes de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*, escolhidas entre o material mais promissor proveniente da EMBRAPA – Centro de Pesquisa Agropecuária do Cerrado (Experimento 1) (H-20, H-24, H-37, H-38, H-39, H-40, H-41 V-23), da EMBRAPA – Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (Experimento 2) (CNPAF 100, 109, 111, 112, 125, 126, 192, 512) e da EMBRAPA – CNPAF e CPAC (Experimento 3) (H-4, H-5, CNPAF 103, 105, 107, 119, 233, 234). As estirpes de *Rhizobium* cresceram em meio de cultura extrato de levedura – manitol – agar (20) a 30°C, por quatro dias com agitação. A inoculação, plantio, desbaste e fornecimento de solução nutritiva foram como descritas anteriormente (10). As plantas cresceram em vasos de Leonard modificados (20), cada um contendo duas plantas e utilizou-se o delineamento experimental em blocos ao acaso, com três repetições e três coletas, respectivamente aos 16, 22 e 27 dias após a emergência (DAE) no experimento 1, aos 17, 24 e 31 DAE no experimento 2 e aos 17, 24 e 30 DAE no experimento 3.

Em cada coleta cortou-se a parte aérea das plantas na altura do nó cotiledonar, lavando-se com água destilada e, após a secagem com papel absorvente, iniciou-se a coleta da seiva do xilema durante 15 minutos, calculando-se posteriormente a taxa de exsudação. A seiva das três repetições (6 plantas) foi co-

letada em um único tubo, que foi mantido a -20°C até o momento de analisar o N-total e o N-ureído (2).

Das duas plantas de cada vaso, uma foi usada para a determinação da atividade da nitrogenase, pelo método de redução do acetileno, e a outra para a determinação da evolução do H₂. A atividade da nitrogenase foi avaliada em raízes noduladas destacadas, incubadas em frascos de 270 ml hermeticamente fechados, durante 4 minutos, em uma atmosfera de 12% do acetileno (10). A determinação do etileno produzido, da evolução do H₂ pelos nódulos e da eficiência relativa da nitrogenase foi realizada conforme descrito anteriormente (10).

A parte aérea, raiz e nódulos foram colocados para secagem em estufa a 60-70°C até atingirem peso constante, determinando-se então o N total (2).

RESULTADOS

No primeiro experimento, pode-se constatar que algumas estirpes, como a H-20, H-37 e H-41 conseguiram se destacar das demais já aos 16 dias após a emergência (DAE), com maior peso seco de nódulos (Tabela 1). Os nódulos dessas estirpes e da H-24 apresentaram coloração rósea desde essa coleta inicial, destacando-se também em relação à atividade e eficiência relativa da nitrogenase (Fig. 1). As plantas inoculadas com essas 4 estirpes mostraram somente leves sintomas de deficiência de N, apresentando maior acúmulo de N total na parte aérea (Tabela 1).

Até o final do ciclo vegetativo, aos 27 DAE, confirmou-se o melhor desempenho dessas estirpes, cuja média de fixação do N₂ superou em 92% a média das demais.

O N total dos nódulos aumentou, em cada coleta, devido ao aumento no número e, consequentemente, no peso seco dos mesmos. A concentração de N nos nódulos, porém, caiu de um valor médio de 5,18% no período de estresse de N (16 DAE) para 4,25% na coleta seguinte, realizada apenas após 6 dias. Nessa mesma época, houve um incremento considerável no transporte de ureídos na seiva do xilema (Fig. 2) e na atividade da nitrogenase (Fig. 1), embora incrementos maiores nesses parâmetros tenham sido observados no período entre 22 e 27 DAE. Durante o período vegetativo analisado os nódulos representaram, em média, 19,7% do N total das plantas.

No segundo experimento, uma análise de todos os parâmetros relativos à precocidade da fixação aos 17 DAE (nodulação, atividade e eficiência da nitrogenase) mostrou um destaque para as estirpes CNPAF

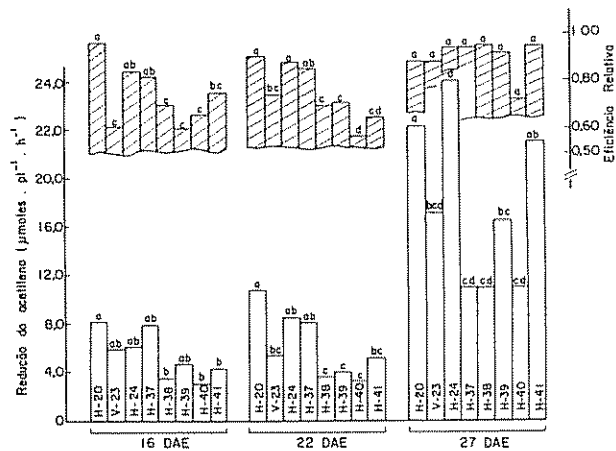


Fig. 1. Efeito de 8 estirpes de *Rhizobium*, provenientes da EMBRAPA - CPAC, na atividade e eficiência relativa da nitrogenase de feijão, cv Negro Argel, durante a fase de crescimento vegetativo. Médias de 3 repetições e valores seguidos pela mesma letra não diferem pelo teste de Duncan ao nível de 5%.

Argel, durante a fase de crescimento vegetativo. Médias de 3 repetições e valores seguidos pela mesma letra não diferem pelo teste de Duncan ao nível de 5%.

111 e CNPAF 112 (Tabela 2 e Fig. 3). Esse desempenho se confirmou também até o período de pré-florescimento, com taxas bastante significativas de fixação do N_2 , ou seja, $3.36 \text{ mg N planta}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ para a CNPAF 111 e de $6.70 \text{ mg N planta}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ para a CNPAF 112 no período entre 24 e 31 DAE (Tabela 2). As estirpes CNPAF 109 e CNPAF 126, embora tenham apresentado uma nodulação e fixação iniciais muito boas, já começaram a ser ultrapassadas pelas CNPAF 111 e, 112 aos 24 DAE (Tabela 2). Uma vez mais, foi verificada uma queda na % N dos nódulos de 4.59% aos 17 DAE (não considerando a estirpe CNPAF 125, que ainda não apresentava nódulos), para 3.87% de N aos 24 DAE (Tabela 2), concomitantemente com um aumento da % N-ureido na seiva do xilema (Fig. 4) e um enorme incremento na atividade da nitrogenase (Fig. 3). Estirpes pouco eficientes, como as CNPAF 125 e 192, além de apresentarem baixa nodulação (Tabela 2) e atividade da nitrogenase (Fig. 3) também apresentaram uma maior perda de elétrons e ATP pela evolução do H_2 aos 17 e aos 31 DAE (Fig. 3) e um menor transporte de ureídos na seiva do xilema (Fig. 4). Os nódulos representaram, na coleta final, 21.75% do N total da planta

Tabela 1. Efeito de 8 estirpes de *Rhizobium*, provenientes da EMBRAPA-CPAC no peso seco (mg.pl^{-1}) e % N dos nódulos e no N total (mg N.pl^{-1}) acumulado em feijão cv. Negro Argel durante a fase de crescimento vegetativo. Médias de 3 repetições. Valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan ($P = 0.05$).

Estirpes de <i>Rhizobium</i>	Nódulos		Parte aérea		Raiz	N total da planta
	Peso seco	% N	N total	N total		
16 dias após a emergência (DAE)						
H-20	88 a	5.35 b	4.64 a	14.05 a	3.22 a	21.86 a
H-24	69 b	5.89 a	4.05 ab	14.12 a	3.06 a	21.13 a
H-37	77 abc	5.82 a	4.46 ab	13.30 a	3.21 a	20.91 a
H-38	59 bc	5.89 a	3.46 bcd	12.70 a	3.86 a	19.93 a
H-39	57 bc	4.43 b	2.54 d	9.50 b	2.36 a	14.34 b
H-40	62 bc	4.63 c	2.86 cd	9.62 b	2.67 a	15.08 b
H-41	79 ab	4.85 c	3.86 abc	15.40 a	3.44 a	22.62 a
V-23	53 c	4.57 c	2.43 d	7.18 b	3.50 a	13.11 b
22 DAE						
H-20	134 a	4.74 ab	6.38 a	28.74 a	3.95 ab	38.96 a
H-24	146 a	4.96 a	7.25 a	29.38 a	4.29 a	40.84 a
H-37	143 a	4.90 a	6.96 a	23.49 ab	3.61 abc	33.94 ab
H-38	162 a	4.82 ab	7.78 a	21.85 b	3.27 abc	32.82 ab
H-39	133 a	3.44 d	4.61 a	13.42 c	3.42 abc	21.36 cd
H-40	101 a	3.23 d	3.30 a	10.09 c	2.47 c	15.79 d
H-41	140 a	3.72 cd	5.22 a	20.15 b	2.93 bc	28.20 bc
V-23	119 a	4.24 bc	5.04 a	8.22 c	2.47 c	15.66 d
27 DAE						
H-20	243 a	4.19 ab	10.30 a	37.98 a	5.21 a	53.34 ab
H-24	202 a	4.65 a	9.43 a	41.52 a	5.87 a	58.72 a
H-37	213 a	4.92 a	10.48 a	38.32 a	4.90 ab	53.60 ab
H-38	218 a	4.75 a	10.39 a	27.80 b	5.21 a	43.36 b
H-39	226 a	3.48 b	7.84 ab	16.79 c	3.74 bc	28.31 c
H-40	124 b	3.86 b	4.74 bc	13.96 c	3.59 bc	22.18 c
H-41	216 a	3.61 b	7.79 ab	36.55 ab	5.20 a	49.10 ab
V-23	93 b	3.72 b	3.48 c	11.47 c	2.81 c	17.72 c

Tabela 2. Efeito de 8 estirpes de *Rhizobium*, provenientes da EMBRAPA-CNPAF no peso seco (mg.pl^{-1}) e % N dos nódulos e no N total (mg N.pl^{-1}) acumulado em feijão, cv. Negro Argel, durante a fase inicial de crescimento. Médias de 3 repetições e os valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan ($P = 0.05$).

Estirpes de <i>Rhizobium</i>	Nódulos			Parte aérea	Raiz	N total da planta
	Peso seco	% N	N total	N total	N total	
17 dias após a emergência (DAE)						
100	23 c	4.18 c	1.0 b	4.87 b	2.04 a	7.91 b
109	72 a	4.38 bc	3.18 a	11.49 a	2.48 a	17.15 b
111	59 ab	5.05 ab	2.97 a	11.84 a	1.93 a	16.74 a
112	76 a	4.89 abc	3.71 a	13.25 a	2.30 a	19.26 a
125	0 c	0 c	0 c	4.39 b	1.86 a	6.26 b
126	65 ab	5.37 a	3.58 a	10.29 a	2.23 a	16.09 a
192	15 c	3.21 d	0.50 b	5.26 b	2.47 a	8.23 b
512	47 b	5.07 ab	2.35 a	5.40 b	1.93 a	9.68 b
24 DAE						
100	89 bc	4.69 a	4.15 b	10.60 bc	2.73 a	17.48 bc
109	131 ab	4.61 a	6.03 ab	17.49 b	4.29 a	27.81 ab
111	158 ab	4.70 a	7.43 a	30.15 a	3.31 a	40.89 a
112	138 ab	4.57 a	6.33 ab	19.61 b	3.66 a	29.60 ab
125	20 d	3.87 b	0.77 c	4.06 c	3.22 a	8.05 c
126	125 ab	4.77 a	5.96 ab	15.62 b	3.06 a	24.65 b
192	32 cd	2.78 c	0.87 c	4.32 c	2.20 a	7.39 c
512	162 a	4.85 a	7.90 a	18.07 b	2.65 a	28.62 ab
31 DAE						
100	141 c	4.73 a	6.66 cdc	25.59 c	2.78 c	35.00 cd
109	340 ab	4.21 ab	14.32 ab	32.66 bc	3.65 bc	50.63 bc
111	316 ab	3.96 b	12.48 abc	46.90 ab	5.06 a	64.44 ab
112	362 a	4.80 a	17.36 a	53.69 a	5.48 a	76.53 a
125	137 cd	3.68 bc	5.04 de	10.17 d	3.57 bc	18.78 de
126	216 bc	4.33 ab	9.35 bcd	38.18 bc	4.50 ab	52.04 bc
192	64 d	3.17 c	2.01 e	3.32 d	2.54 c	7.88 e
512	171 cd	4.10 ab	7.03 cde	25.41 c	3.51 c	35.95 cd

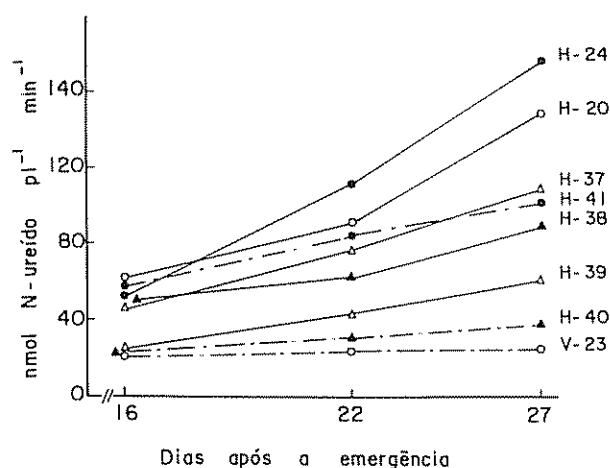


Fig. 2. Taxa de transporte de N-ureído na seiva do xilema de feijão, cv. Negro Argel, inoculado com 8 estirpes de *Rhizobium*. Cada ponto representa a seiva coletada de 6 plantas.

No terceiro experimento, as estirpes H-5 e CNPAF 103 foram extremamente tardias na nodulação (Tabela 3). A estirpe CNPAF 234 apresentou maior precocidade de nodulação e fixação do N_2 já acumulando, aos 17 DAE, teores de N na parte aérea significativamente maiores do que nas plantas inoculadas com as outras estirpes. Até a coleta final, no pré-florescimento, destacaram-se as estirpes CNPAF 119, CNPAF 233 e CNPAF 234 (Tabela 3). Os dados de atividade da nitrogenase e transporte de N na seiva do xilema não foram aqui colocados porque concordam com os dados obtidos nos outros dois experimentos, ou seja, essas três estirpes apresentaram maior atividade da nitrogenase, menor evolução do H_2 pelos nódulos, maior transporte de N total na seiva do xilema e maior produção de ureídeos. Novamente também se observou um decréscimo na % N média dos nódulos de 4.55% aos 17 DAE para 4.16% aos 24 DAE (Tabela 3). Aos 30 DAE o N total dos nódulos representou 19.76% do N total das plantas (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito de 8 estirpes de *Rhizobium*, provenientes da EMBRAPA-CPAC e CNPAF, no peso seco (mg.pl⁻¹ e % N dos nódulos e no N total (mg N.pl⁻¹) acumulado em feijão, cv. Negro Argel, até os 27 dias após a emergência (DAE). Médias de 3 repetições e valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan (P = 0.05).

Estirpes de <i>Rhizobium</i>	Nódulos			Parte aérea	Raiz	N total da planta
	Peso seco	% N	N total	N total	N total	
17 DAE						
H-4	22 c	2.80 b	0.62 c	5.42 cd	2.42 a	8.46 d
H-5	0 c	0 c	0 c	4.75 d	2.40 a	7.15 d
103	0 c	0 c	0 c	4.76 d	2.49 a	7.25 d
105	50 b	4.85 a	2.42 b	6.58 ed	2.77 a	11.77 c
107	82 a	4.90 a	4.02 a	9.15 b	2.60 a	15.77 b
119	54 b	4.90 a	2.65 b	7.64 bc	2.68 a	12.97 bc
233	49 b	4.90 a	2.40 b	7.44 bc	2.67 a	12.51 bc
234	102 a	4.93 a	5.03 a	13.48 a	2.55 a	21.06 a
24 DAE						
H-4	33 d	2.68 b	0.88 d	5.62 d	2.72 a	9.22 d
H-5	0 d	0 c	0 d	4.80 d	2.50 a	7.30 d
103	0 d	0 c	0 d	4.11 d	2.50 a	7.41 d
105	114 c	4.70 a	5.36 c	12.00 c	3.23 a	17.28 c
107	104 c	4.55 a	4.73 c	14.22 bc	3.63 a	22.58 b
119	178 a	4.36 a	7.76 a	18.94 a	3.71 a	30.41 a
233	127 bc	4.37 a	5.55 bc	16.23 ab	3.51 a	25.29 ab
234	153 ab	4.30 a	6.58 ab	15.62 abc	3.36 a	25.56 ab
30 DAE						
H-4	68 b	2.72 b	1.85 d	7.84 c	3.68 c	13.37 c
H-5	17 b	2.94 b	0.50 d	5.79 c	3.42 c	9.71 c
103	22 b	3.95 a	0.87 d	5.80 c	3.66 c	10.33 c
105	182 a	4.50 a	8.19 c	27.20 b	3.84 bc	39.23 b
107	226 a	4.45 a	10.06 b	25.71 b	4.67 abc	40.44 b
119	219 a	4.30 a	9.42 b	40.45 a	5.71 a	55.58 a
233	188 a	4.98 a	9.36 b	41.03 a	5.15 ab	55.54 a
234	239 a	4.99 a	11.93 a	39.27 a	4.58 abc	55.78 a

DISCUSSÃO

Na simbiose *Rhizobium* – leguminosa ocorre um fluxo constante de C proveniente da fotossíntese para os nódulos e de N proveniente da fixação para a planta hospedeira. Por isso, desde os estudos realizados na década de 30, a fotossíntese foi considerada como o fator limitante para a fixação do N₂ (14). Em leguminosas que produzem grãos grandes, como soja e feijão, o início da nodulação pode ocorrer independentemente da fotossíntese, somente às custas das reservas cotiledonares (15). Logo depois, porém, os nódulos passam a constituir um dreno considerável de fotosintatos, competindo com outros órgãos em crescimento, e vários trabalhos mostraram que a fixação do N₂ estaria limitada, já nessa fase inicial, pela disponibilidade de C (14). William *et al.* (24), porém, ao fornecerem CO₂ ou N mineral às plântulas de soja noduladas, observaram que o desenvolvimento e funcionamento inicial dos nódulos estavam limitados pela disponibilidade de N e não pela disponibilidade de fotosintatos. Essa observação indica que a deficiência inicial de N que ocorre antes do funcionamento pleno

dos nódulos prejudica não só a nutrição nitrogenada da planta hospedeira como a formação e funcionamento dos próprios nódulos.

A seleção de estirpes de *Rhizobium* com nodulação e fixação do N₂ precoces, portanto, é crucial tanto para o melhor crescimento das plantas no início do ciclo vegetativo como para a própria formação e funcionamento dos nódulos, mas pouca atenção tem sido dada a essa seleção. Voss (22) constatou, através de observações visuais da intensidade da coloração verde, que o início da fixação do N₂ variava entre os 19 e os 26 dias após a emergência em feijão cv. Carioca inoculado com 40 diferentes estirpes. Essa diferença de 7 dias em uma planta cujo ciclo está por volta de 70-80 dias, tem reflexos diretos na produção. Pelos dados apresentados neste trabalho, pode-se constatar que algumas estirpes, como a H-20, H-24, H-37, H-41, CNPAF 111, CNPAF 112, CNPAF 119, CNPAF 233 e CNPAF 234 conseguiram ser bastante precoces, apresentando maior atividade da nitrôgenase e baixa perda de elétrons pela evolução do H₂ pelos nódulos já aos 16-17 DAE. O transporte de N

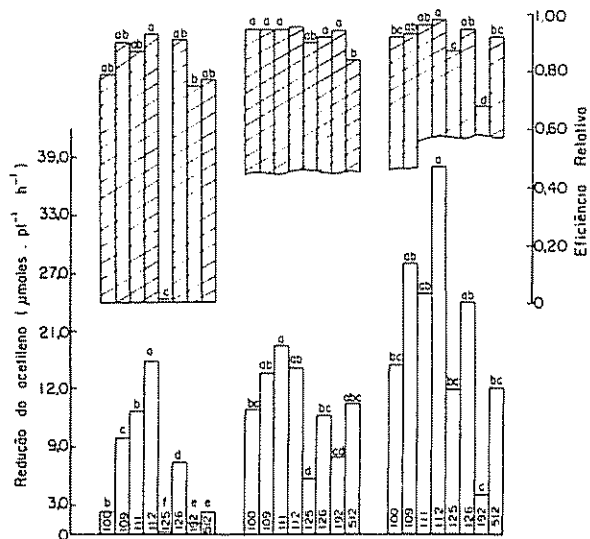


Fig. 3. Efeito de 8 estirpes de *Rhizobium* provenientes da EMBRAPA - CNPAF, na atividade e eficiência relativa

$$(ER = 1 - \frac{H_2/ar}{C_2H_4}) \text{ da nitrogenase de feijão, cv.}$$

Negro Argel, durante a fase de crescimento vegetativo. Médias de 3 repetições e valores seguidos pela mesma letra não diferem pelo teste de Duncan ao nível de 5%

total na seiva do xilema também foi maior, nessa época, nas plantas inoculadas com essas estirpes, o que resultou em maiores teores de N total na parte aérea já na primeira coleta e as plantas apresentaram apenas leves sintomas de clorose

As estirpes precoces também apresentaram maiores teores de N sob a forma de ureídeos na seiva do xilema. Os ureídeos representam a principal fração de N transportado na seiva do xilema de feijão nodulado (5, 10). De alguma forma as estirpes podem afetar o metabolismo de N nos nódulos e as combinações simbióticas mais eficientes passam a transportar mais N sob a forma de ureídeos (10), provavelmente devido à baixa relação C:N desses compostos (1, 0), o que representa uma economia considerável de esqueletos de C. Essa relação entre eficiência e transporte de ureídeos é também confirmada neste trabalho, observando-se também um aumento na produção desses compostos nitrogenados a partir dos 16 DAE.

Nos três experimentos conduzidos constatou-se que, aos 16-17 DAE, época de maior intensidade do estresse de N, a % de N dos nódulos era elevada, em média 4,77%. Apenas 6-7 dias depois, quando as plantas já exibiam coloração verde intensa, a % de N nos nódulos caiu para 4,09%, portanto cerca de 17%. Um relato semelhante foi feito em 1920 por Joshi (13), que relatou que a % de N nos nódulos de

Crotalaria caiu de 10,81% na primeira semana para 3,36% de N cinco semanas mais tarde. As observações de Joshi e as deste experimento podem indicar que, apesar da atividade da nitrogenase às vezes ser elevada antes mesmo dos 16 DAE, o transporte do N_2 fixado para a parte aérea ainda não ocorre totalmente, havendo um acúmulo de N nos nódulos. Uma hipótese seria a de que a ligação entre os vasos do xilema dos nódulos e da planta hospedeira ainda não estaria totalmente completada. Outra hipótese poderia ser a de que as enzimas responsáveis pela assimilação da amônia fixada ainda não estariam em plena atividade. Isso poderia ocorrer porque há evidências de que a indução dessas enzimas resulta do estabelecimento da excreção de amônia pelos bacteróides (18)

Tem sido generalizada a idéia de que as leguminosas epigeas, como soja e feijão, quando noduladas, apresentam um período inicial de estresse de N (19). Os resultados dos três experimentos aqui relatados, porém, mostraram que é possível selecionar estirpes de *Rhizobium* para o feijoeiro que nodulem e fixem N_2 precocemente. As melhores estirpes acumularam, até o período pré-florescimento, entre 49,10 e 76,53 mg de N por planta. Esses valores são bastante elevados e abrem perspectivas promissoras para que se possa eliminar a "dose de arranque" de fertilizante nitrogenado, normalmente usada em feijoeiro nodulado, e que prejudica a nodulação e fixação do N_2 .

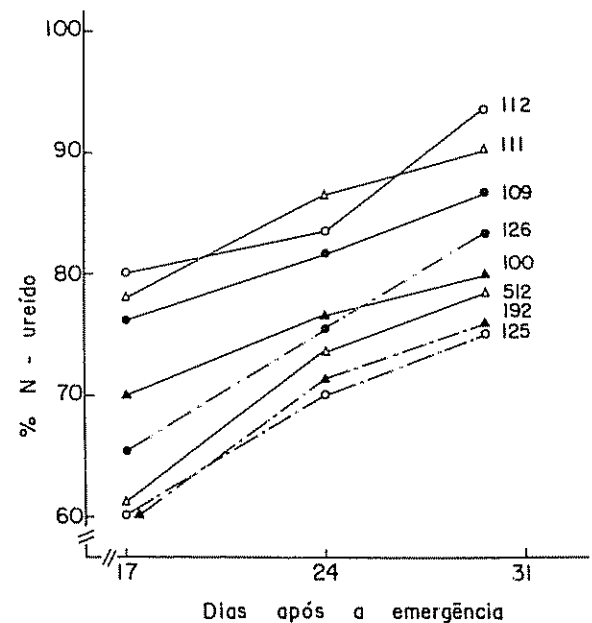


Fig. 4. % N ureido ($\frac{N \text{ ureido}}{N \text{ total}} \times 100$) na seiva do xilema de feijão, cv Negro Argel, inoculado com 8 estirpes de *Rhizobium*. Cada ponto representa a seiva coletada de 6 plantas.

LITERATURA CITADA

- 1 BECANA, M.; SPRENT, J. I. 1987. Nitrogen fixation and nitrate reduction in the root nodules of legumes. *Physiologia Plantarum* 70:757-765.
- 2 BODDEY, R.M.; PEREIRA, J.A.R.; HUNGRIA, M.; THOMAS, R.J.; NEVES, M.C.P. 1987. Methods for the study of nitrogen assimilation and transport in grain legumes. *MIRCEN Journal* 3:3-22.
- 3 BURTON, J.C. 1974. Pragmatic aspects of the *Rhizobium*. Leguminous plant association. In *Proceedings of the First International Symposium on Nitrogen Fixation*. Ed. by Newton, W.E.; Nyman, C.J. Washington, D.C.: State University Press. v.1, p. 429-446.
- 4 CARTWRIGHT, P.M. 1967. The effect of combined nitrogen on the growth and nodulation of excised roots of *Phaseolus vulgaris* L. *Annals of Botany* 31:309-321.
- 5 COOKSON, C.; HUGHES, H.; COOMBS, J. 1980. Effects of combined nitrogen on anapleurotic carbon assimilation and bleeding sap composition in *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* 148:338-345.
- 6 DUBOIS, J.D.; BURRIS, R.H. 1986. Comparative study of N uptake and distribution in three lines of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) at early pod filling stage. *Plant and Soil* 93:79-86.
- 7 FRANCO, A.A.; MUNNS, D.N. 1982. Nodulation and growth of *Phaseolus vulgaris* in solution culture. *Plant and Soil* 66:149-160.
- 8 HARDY, R.W.F.; HOLSTEN, R.D.; JACKSON, E.K.; BURNS, R.C. 1968. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiology* 43:1185-1207.
- 9 HILDEBRAND, D.F.; HARPER, J.E.; HYMOWITZ, F. 1981. Effect of nitrate level on nitrogen metabolism in winged and soya bean. *Annals of Botany* 48:307-313.
- 10 HUNGRIA, M.; NEVES, M.C.P. 1986. Interação entre cultivares de *Phaseolus vulgaris* e estirpes de *Rhizobium* na fixação e transporte do nitrogênio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 21:127-140.
- 11 HUNGRIA, M.; THOMAS, R.J. 1987. Effects of cotyledons and nitrate on the nitrogen assimilation of *Phaseolus vulgaris*. *MIRCEN Journal* 3:411-419.
- 12 HUNGRIA, M.; NEVES, M.C.P.; VICTORIA, R.L. 1985. Assimilação do nitrogênio pelo feijoeiro II. Absorção e translocação do N mineral e do N₂ fixado. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 9:201-209.
- 13 JOSHI, N.V. 1920. Studies on the root nodule organism of the leguminous plants. *Bacteriology Series* 1:274-276.
- 14 NEVES, M.C.P.; HUNGRIA, M. 1987. The physiology of nitrogen fixation in tropical grain legumes. *CRC Critical Review in Plant Sciences* 3:267-321.
- 15 RAGGIO, M.; RAGGIO, N. 1956. Relación entre cotiledones y nodulación y factores que la afectan. *Phyton* 7:103-119.
- 16 RENNIE, R.J.; KEMP, G.A. 1984. N-determined time course for N₂ fixation in two cultivars of field bean. *Agronomy Journal* 76:146-154.
- 17 RIGAUD, J. 1981. Comparison on the efficiency of nitrate and nitrogen fixation in crop yield. In *Nitrogen and Carbon Metabolism*. Ed. by Bewley, J.D. The Hague, Martinus Nijhoff. p. 217-248.
- 18 ROBLERTSON, J.G.; FARNDEN, K.J.F.; WARBURTON, M.P.; BANS, J.A.M. 1975. Induction of glutamine synthetase during nodule development in lupin. *Australian Journal of Plant Physiology* 2:265-272.
- 19 SPRENT, J.; THOMAS, R.J. 1984. Nitrogen nutrition of seedlings of grain legumes: some taxonomic, morphological and physiological constraints. *Plant, Cell and Environment* 7:637-645.
- 20 VINCENT, J.M. 1970. *Manual for the practical study of root nodule bacteria*. Oxford, Blackwell. 164 p. (International Biological Program Handbook no. 15).
- 21 VINCENT, J.M. 1974. Root-nodule symbiosis with *Rhizobium*. In *The biology of nitrogen fixation*. Ed. by Quispel, A. Amsterdam, North-Holland Publishers. p. 265-341.
- 22 VOSS, M. 1981. Seleção de *Rhizobium phaseoli* de regiões produtoras de feijão do Rio Grande do Sul. Tese de Mestrado. Porto Alegre, UFRS. 75 p.
- 23 WESTERMAN, D.T.; KOLAR, J.J. 1978. Symbiotic N₂ (C₂H₂) fixation by bean. *Crop Science* 18:986-990.
- 24 WILLIAMS, L.E.; DE JONG, T.M.; PHILLIPS, D.A. 1981. Carbon and nitrogen limitations on soybean seedling development. *Plant Physiology* 68:1206-1209.

Interspecific Hybridization of *Phaseolus vulgaris*, *P. acutifolius* and *P. lunatus* Using *in vitro* Technique¹

J.B. Cabral*, O.J. Crocimo**

ABSTRACT

Hybrid embryos from the interspecific crosses between *Phaseolus vulgaris* x *P. acutifolius* and *P. vulgaris* x *P. lunatus* were rescued using a culture medium developed at our laboratory. From 44 hybrid embryos, eight differentiated into normal intact plants. Use of White's nutrient before pollination did not increase fertility in the interspecific crosses. The segregant material line F₂, from *P. lunatus*, obtained in the intraspecific cross between cultivars Fava Branca x Fava Pintada, led to a hybrid plant between *P. vulgaris* x *P. lunatus*. Morphological characteristics, such as leaf type and root system, peculiar to the *P. acutifolius* species, were observed in the hybrid from the cross *P. vulgaris* x *P. acutifolius*.

INTRODUCTION

Mendel (7) was the first to obtain successful interspecific hybridization in the bean *Phaseolus*. He described hybrids between *P. vulgaris* x *P. coccineus* and the segregation in the F₂ generation. Recently, achievements in hybridization within the genus *Phaseolus* have been reviewed (8).

P. vulgaris has great importance as a staple food in several regions of the world, but some regions, such as semi-arid northeastern Brazil, are not suitable for growing this crop due to adverse climatic conditions. Other species, such as *P. lunatus* and *P. acutifolius*, can be grown in those regions since they tolerate high temperatures and water stress, but their commercial value is much lower than that of *P. vulgaris*. *P. lunatus* and *P. acutifolius* are important species to be used in interspecific crosses with *P. vulgaris* in

¹ Received for publication 3 May 1988.

The authors acknowledge the Commission of the European Economic Community for the grant through Contract no. 33 007 TSD 222 and FINEP/Rio/Brasil through Contract no. 42.87.0411 00.

* Senior Researcher, Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, IPA, 50 000 Recife, Pernambuco, Brasil.

** General Coordinator, Centro de Biotecnologia Agrícola CEBTEC/FEALQ, Dept. de Química, E.S.A. "Luiz de Queiroz" Universidade de São Paulo, 13400 Piracicaba, SP, Brasil.

RESUMO

Embriões híbridos provenientes de cruzamentos interespecíficos entre *Phaseolus vulgaris* x *Phaseolus acutifolius* e *Phaseolus vulgaris* x *Phaseolus lunatus* foram inoculados em meio de cultura estabelecido em nossos laboratórios. De 44 embriões híbridos inoculados, 8 se diferenciaram para gerar plântulas intactas ou malformadas. Observou-se que o emprego da solução nutritiva de White antes das polinizações, aplicada diretamente à superfície do estigma da flor utilizada como fêmea, não aumentou a fertilidade nos cruzamentos interespecíficos. O emprego de material segregante (linha de geração F₂, obtida do cruzamento intra-específico entre as cultivares Fava Branca x Fava Pintada) da espécie *P. lunatus*, possibilitou a obtenção de uma planta híbrida entre *P. vulgaris* x *P. lunatus*. Características morfológicas como o tipo de folha e do sistema radicular, peculiar a espécie *P. acutifolius*, foram observadas no híbrido proveniente do cruzamento entre *P. vulgaris* x *P. acutifolius*.

order to obtain stress-tolerant germplasm. Embryo-culture techniques have been used to obtain fertile allopolyploids from the cross *P. acutifolius* x *P. vulgaris* (14). The same approach has been used to obtain fertile interspecific hybrids from the same cross (17). More recently, *in vitro* embryo culture has also been used to obtain interspecific hybrids in the cross *P. vulgaris* x *P. angustissimus* (4).

The present study reports that interspecific hybrids between *P. vulgaris* x *P. acutifolius* and *P. vulgaris* x *P. lunatus* have been obtained using the embryo rescue approach.

MATERIALS AND METHODS

Three bean species were used: *P. vulgaris*, *P. acutifolius* and *P. lunatus*. The following cultivars of each species were used: *P. vulgaris*, cvs. Gordo, Goiano Precoce, Canario 101, Oax-62 and California "small white," and the Carioca Precoce 1070 line (mutant, obtained through gamma radiation, selected at M₄ generation); *P. acutifolius*: cvs. G-40018, G-40035, G-40064, G-40002, Tepari Branco, Tepari Roxo; *P. lunatus*: cvs. IPA-1, G-25143 and "Line F₂" generation (from the cross Fava Branca x Fava Pintada).

Pollination, conducted in the greenhouse, followed techniques described by Buishand (3) and Honma (5)

with some modifications. The cultivars of *P. vulgaris* were used as female (♀) and the cultivars of *P. acutifolius* and *P. lunatus* as male (♂)

A group of 127 flowers received White's nutrient solution (9) on the surface of the emasculated flower. Another group of 50 flowers was pollinated without White's nutrient solution

Intact immature embryos excised from hybrid seeds at several stages of development inside the pods were inoculated in the following culture medium: a) mineral salts of Murashige and Skoog (13): sucrose, 30 g/l; enzyme hydrolysed casein, 2 g/l; mio-inositol, 100 mg/l; thiamine HCl, 8 mg/l; nicotinic acid, 5 mg/l; pyridoxine HCl, 0.6 mg/l; niacinamide, 1.25 g/l; glutamine, 25 mg/l; pH 5.6

Pods were disinfected by immersion in 95% ethanol for 1 min, followed by immersion in a 20% hypochlorite commercial solution, for 5 min, then rinsed twice in sterilized de-ionised water. They were then aseptically dissected under the stereomicroscope and intact embryos without maternal teguments were inoculated in the culture medium. The embryo culture was conducted in a growth cabinet under 25°/21°C (day/night), light intensity 54 000 w m⁻², with a 16h/8h photoperiod.

Plantlets were transferred either to sterile solid substrate made of organic matter, vermiculite, and quartz sand sphagnum (3: 1/2: 2/3: 2/3), or to Hoagland and Arnon (2) nutrient solution diluted to 50%

RESULTS AND DISCUSSION

The most favorable results, due either to the number of interspecific embryo hybrids obtained without White's solution or to the number of hybrid intact plants, were obtained with *P. vulgaris* cvs Gordo, Goiano Precoce and the mutant line Carioca Precoce 1070. The best cultivars of *P. acutifolius* and *P. lunatus* were G-40035, G-40002 and Line F₂. The latter, from *P. lunatus*, was the best as far as interspecific hybrid plant production is concerned when crossed with cv. Goiano Precoce of *P. vulgaris*. Genetic differences between *P. vulgaris* and *P. lunatus* species, which is a handicap in obtaining interspecific hybrids, have been reported (10, 15). The hybrid plant obtained in the present work was probably due to the fact that a segregating material was used (line F₂ generation) as male, introducing a wider genetic variability than a pure cultivar. In the same type of cross, *P. vulgaris* x *P. lunatus*, the best results were obtained when segregant lines were used (7)

The use of White's nutrient solution did not provide the same results as those obtained in the *P.*

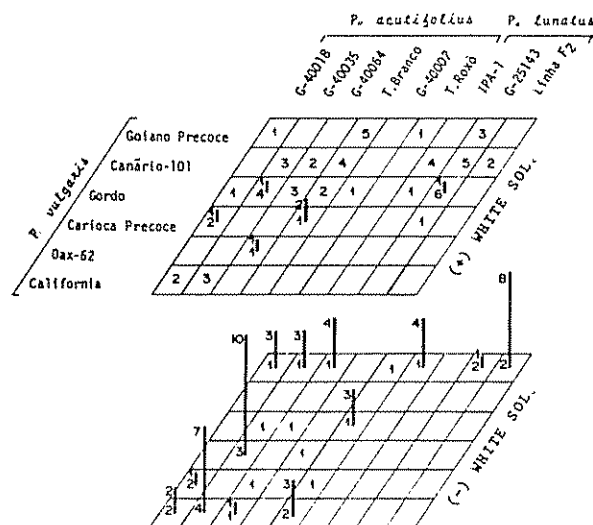


Fig 1 Effect of White's nutrient solution in obtaining interspecific hybrids between *P. vulgaris* x *P. acutifolius* and *P. vulgaris* x *P. lunatus*: number at bottom bar = pod number; number at top bar = number of hybrid embryos; absence of bar = absence of hybrid embryos; number without bar = pod number

coccineus x *P. vulgaris* cross (9). When White's solution was used, the number of pods was higher and the number of embryos smaller. Fig. 1 shows that crosses between California x G-40035, Carioca Precoce x G-40035 and Goiano Precoce x Line F₂ resulted in seven, 10 and eight embryos in four, three and two pods, respectively. Out of 127 flowers which received White's nutrient solution, only 58 pods and six embryos were obtained. On the other hand, out of 50 flowers which did not receive White's solution, 29 pods and 50 hybrid embryos were obtained.

Embryos from *P. vulgaris* x *P. lunatus* crosses were less developed, abnormal and at the pre-heart-shape stage, as described by other authors (12). However, some of the embryos from *P. vulgaris* x *P. acutifolius* presented two asymmetric cotyledons and reached cotyledonary development. Nevertheless, the seed did not mature.

As reported in the literature (17), a great variation was noted in the number of cotyledons in the embryos from *P. vulgaris* x *P. acutifolius* crosses: presence or absence of three abnormal cotyledons. The most vigorous embryos came from Goiano Precoce x T. Roxo, Goiano Precoce x G-40035, Goiano Precoce x G-40018, California x G-40035, Canario 101 x G-40002 crosses, and some other combinations. The immature embryos excised and inoculated 18 days after pollination (18 DAP) did not differentiate in culture. However, embryos of the same age (18-20 DAP), but at the first stage of cotyledonary development (globular), presented a higher rate of differen-

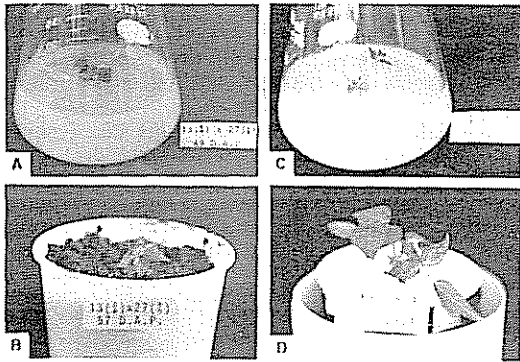


Fig 2 Hybrid plantlet between *P. vulgaris* x *P. lunatus* originated from the cross cv. Goiano Precoce x Line F₂ (2 A, B), with 49 DAP (2A) and 57 DAP (2B); hybrid plantlet between *P. vulgaris* x *P. acutifolius* originated from the cross cv. Gordo x cv. G-40002 (2 C, D), with 70 DAP (2C) and 89 DAP (2D)

tiation, regenerating intact hybrid plants. A possible explanation is that the embryo axis of more developed (torpedo stage) immature embryos utilize the nutritional reserves already existing in the attached cotyledons for their differentiation. A greater contact surface between the embryo axis and the cotyledons, rather than the culture medium, is therefore established. Biochemical processes leading to toxic products would interfere in the relationship embryo axis/cotyledons/culture medium, thereby turning off differentiation and development of hybrid plants. This hypothesis is supported by the findings of other authors (1).

Out of 44 hybrid embryos, from pollination without White's solution, eight differentiated into intact plants. These embryos came from crosses between Carioca Precoce x G-40035, California x G-40002, California x G-40035, Goiano Precoce x Line F₂ and Gordo x G-40002. Fig 2 shows the hybrid plants obtained in the latter two crosses.

The plantlet shown in Fig 2A originated from a *P. vulgaris* x *P. lunatus* cross and was transplanted to solid substrate (Fig. 2B). Fig 2 (C, D) shows the hybrid plantlet from a *P. vulgaris* x *P. acutifolius* cross at different stages of development in different media. This plantlet was transplanted directly from the culture medium to a Hoagland and Arnon (2) nutrient solution diluted to 50%. Thirteen days after transference, the plantlet showed vigorous growth and new leaves were formed, developing morphological characteristics of *P. acutifolius*, such as leaf shape, tendency to bend and petiole type, as has been observed previously (6) in the F₁ generation of hybrids from *P. vulgaris* x *P. acutifolius*, mainly in the leaf shape of young plants. Predominance of *P. acutifolius* in the F₁ generation of such crosses has already been reported (16,

17). The leaves of the hybrid had a rough surface and virus symptoms, also observed by other authors in interspecific crosses between *Phaseolus* species (1, 14). During its development, the plantlet (Fig 2D) showed characteristics of both parents in the shoot, such as foliar morphology, which had also been observed in previous reports (6). This plant was sterile and did not flower. Indeed the problem of sterility among hybrids in the F₁ generation is a limiting factor in the transference of germplasm among these species (16). This could be overcome either through backcrossing or by the production of allotetraploids through treatment with colchicine (14). Doubling of the chromosome stock in embryo hybrids from *P. vulgaris* x *P. angustissimus* by applying colchicine on embryos 26 hours after planting has recently been reported (14).

Fig 3 shows the root system of the hybrid plant shown in Fig. 2D. It is a long system, characteristic of *P. acutifolius*, and is not observed in the cultivar Gordo (*P. vulgaris*) used as a pollen source in the cross. These results emphasize the possibility of transferring the genetic character of a long root system from *P. acutifolius* to *P. vulgaris*. The latter would then have higher water absorption efficiency and would therefore be less vulnerable to climatic adversities.

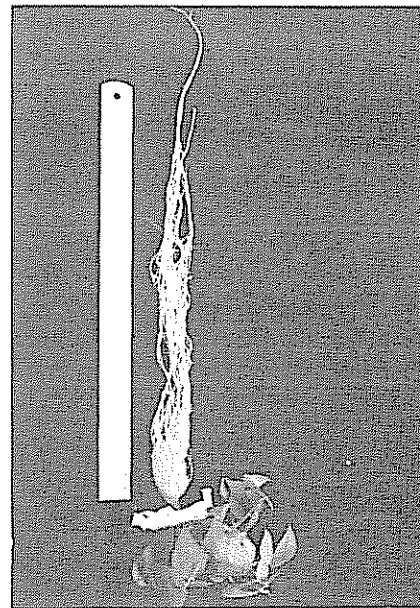


Fig 3 Hybrid intact plant between *P. vulgaris* x *P. acutifolius* (see Fig. 2 C, D) originated from the cross cv. Gordo x cv. G-40002 with 115 DAP. The long root system, peculiar to the *P. acutifolius* species which has been transferred to the *P. vulgaris*, can be noted.

LITERATURE CITED

1. ALVAREZ, M.N.; ASCHER, P.D.; DAVIS, D.W. 1981. Interspecific hybridization in *Euphaseolus* through embryo rescue. *HortScience* 16(4):54-63.
2. HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.J. 1950. The water culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station Circular no. 347.
3. BUISSHAND, I.J. 1956. The crossing of beans (*Phaseolus* spp.) *Euphytica* 5:41-50.
4. BELIVANIS, T.; DORÉ, C. 1986. Interspecific hybridization of *Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus angustissimus* A. Gray using *in vitro* embryo culture. *Plant Cell Reports* 5:329-331.
5. HONMA, S. 1956. A bean interspecific hybrid. *Journal Heredity* 47:217-220.
6. HONMA, S.; HEECKT, O. 1959. Interspecific hybrid between *Phaseolus vulgaris* and *P. lunatus*. *Journal Heredity* 50:233-237.
7. HUCL, P.; SCOLLES, G.J. 1985. Interspecific hybridization in the common bean: a review. *HortScience* 20(3):352-357.
8. IBRAHIM, A.M.; COYNE, D.P. 1975. Genetic of stigma shape, cotyledon position and flower color in reciprocal crosses between *Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus coccineus* (Lam.) and implications in breeding. *Journal American Society of Horticultural Science* 100(6):622-626.
9. KLOZ, J.; KLOZOVÁ, E.; TURKOVA, V. 1966. Chemotaxonomy and genesis of protein characters with special references to the genus *Phaseolus*. *Preslia (Praha)* 38:229-236.
10. MENDEL, G. 1866. Versuche Über Pflanzenhybriden. *Verhandlungen der Naturforschenden Versuche*. *Brun* 4:3-47.
11. MOK, D.W.S.; MOK, M.C.; RABAKOARIHANTA, A. 1978. Interspecific hybridization of *Phaseolus vulgaris* with *P. lunatus* and *P. acutifolius*. *Theoretical Applied Genetics* 52:209-215.
12. MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
13. PRENDOJA, K.; BAUDOUIN, J.P.; MARECHAL, R. 1982. Fertile allopolyploids from the cross *P. acutifolius* x *P. vulgaris*. *Bulletin Recherche Agronomique (Gembloux)* 17(2):177-190.
14. SMARIT, J. 1970. Interspecific hybridization between cultivated American species of the genus *Phaseolus*. *Euphytica* 19:480-489.
15. THOMAS, C.V. 1983. Genetic, morphological and physiological studies of drought and heat resistance in tepary beans (*Phaseolus acutifolius* A. Gray) and common bean (*P. vulgaris* L.). Ph.D. Thesis. Riverside, University of California. 90 p.
16. THOMAS, C.V.; WAINES, J.G. 1984. Fertile backcross and allotetraploid plants from crosses between tepary beans and common beans. *Journal of Heredity* 75:93-98.

Site Index and Height Growth Curves for *Pinus oocarpa* Schiede in Central Honduras¹

C.T. Stiff*, D.N. Perez**, F.D. Johnson*

ABSTRACT

Polymorphic site index and height growth equations are provided for *Pinus oocarpa* growing in pure and mixed upland pine forests of central Honduras. Stem-analysis data from 389 codominant/dominant site trees were used to estimate site index and average height growth for 195 sampled plots. Site index was defined as the average total height of site trees at an index age of 15 years located at breast height. Weighted regression, with 1 325 plot observations, was used to fit both models. A linear site index model explained 95% of the variability in plot site index and had an unweighted 1.26 m standard error. A logistic height growth model fit with nonlinear regression explained 95% of the variability in height with an unweighted standard error of 1.27 m. Precision curves are presented for determining sample size, and field procedures outlined for applying site index and height growth equations.

INTRODUCTION

In Honduras most forest management activities are concentrated in the pine forests, which produce over 90% of wood exports. A serious impediment to forest management has been determining optimal land use. Honduran foresters are currently assessing site quality using a combination of slope, soil depth, and present use. While these factors are certainly important, a system which predicts site

COMPENDIO

Ecuaciones de Índice de Sitio y crecimiento en altura polimórficas fueron desarrolladas para *Pinus oocarpa*, creciendo en rodales mixtos y puros en los pinares de tierras altas del centro de Honduras. Datos de análisis de tallo obtenidos en 389 árboles dominantes y codominantes, aptos para la determinación del Índice de Sitio (árboles sitio), se usaron para estimar Índice de Sitio y crecimiento promedio en altura en una muestra de 195 parcelas. El Índice de Sitio se definió como la altura total promedio de los árboles sitio (dominantes y codominantes) a la edad clave a la altura del pecho igual a 15 años. Un total de 1 325 observaciones se usaron para ajustar ambos modelos mediante regresión ponderada. Un modelo lineal fue usado para el Índice de Sitio, este modelo explicó el 95% de la variabilidad del Índice de Sitio en las parcelas muestra con un error estándar sin ponderar de 1.26 m. Un modelo logístico fue usado para ajustar la ecuación de crecimiento en altura, el ajuste fue realizado usando regresión no lineal y explicó un 95% de la variabilidad de la altura con un error estándar sin ponderar de 1.27 m. Curvas para determinar precisión y tamaño de la muestra requeridos para el uso correcto de las ecuaciones, junto a instrucciones de terreno para la aplicación de las curvas de Índice de Sitio y crecimiento en altura se presentan como parte integral de este trabajo.

quality and potential productivity is essential for the rational allocation of money and personnel, and for prediction of future wood supplies

The objective of this study was to develop a site classification system which could be readily applied by Honduran foresters to the multiple-use management of pine forests in central Honduras (1). A major feature of the system was that sites were evaluated on the basis of the growth and productivity of *Pinus oocarpa* Schiede

This paper presents equations which provide estimates of *Pinus oocarpa* site index and height growth (2). Site index curves predict growth potential from height and age in existing stands, while height growth curves express average height development in stands of a given site index. Precision curves are also reported for determining sample size, along with field procedures for applying site index and height growth equations

¹ Received for publication 16 March 1989.

Prepared as contribution No. 333 of the Idaho Forest, Wildlife and Range Experiment Station, University of Idaho, Moscow, ID 83843. This study was supported by the United States Agency for International Development, Office of Science and Technology (AID/SCI 2E-05) and the Corporación Hondureña de Desarrollo Forestal (COHDEFOR). The authors thank forestry technicians from the Escuela Nacional de Ciencias Forestales (ESNACIFOR) and T.V. Dechert, University of Idaho, for field data collection.

* Assistant Professor and Professor, Department of Forest Resources, College of Forestry, Wildlife and Range Sciences, University of Idaho, Moscow, ID 83843, USA.

** Professor, Escuela Nacional de Ciencias Forestales, Corporación Hondureña de Desarrollo Forestal, Apartado Postal No. 2, Siguatepeque, Honduras

Study area

About 17% of the interior highlands of Honduras are covered with pinelands which are dominated by *Pinus oocarpa*, but include *Pinus maximinoi* and *Pinus tecunumanii* at higher elevations, and *Pinus caribaea* in the dry valleys. *Pinus oocarpa*, the primary commercial species, covers about 1.8 million ha at elevations ranging from 600 to 1900 masl where it often forms pure stands. The study area, centered within 100 km of Siguatepeque, included nearly 500 000 ha of upland pine forests in central Honduras (Fig. 1).

Interior pine forests vary from open and savanna-like to dense with closed canopy, depending on site and precipitation. The terrain is mountainous, with steep slopes being more common than gentle ones. Undergrowth varies from low-density grasses to dense mid-shrubs with scattered young broadleaf trees. The presence of broadleaf species within the pine forests leads many observers to believe the pine is seral to a subtropical deciduous or semievergreen forest. Geological materials and soils affect forest composition and productivity in the upland pine forests, but relationships are poorly understood. The soils are generally nutrient-deficient. Fire may well be the most important functional element of the pine ecosystem, and is undoubtedly necessary to retain the high level of pine composition.

The climate of central Honduras is subtropical, with moist summers and dry winters. The upland pine forests have a wet season with two periods of maximum precipitation (June-July and September-November), and a long dry season from December to May. The average annual precipitation is 1900 mm with only 60 mm falling from January through April (3). Precipitation generally increases with elevation

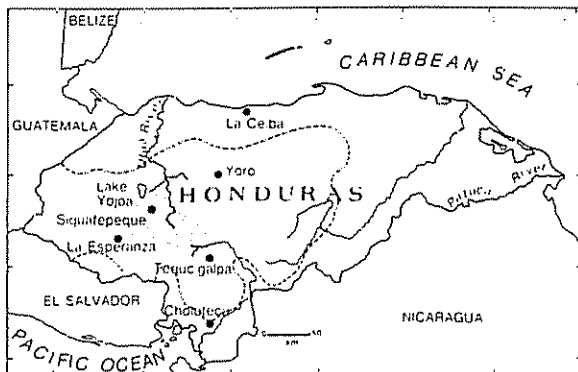


Fig 1 Study area in Honduras (shaded), centering near Siguatepeque. Interior pine forests delimited by broken line.

Table 1. Number of sampled plots by site index class for levels of slope, aspect, and elevation.

Levels of slope, aspect and elevation	Site index class (m) at age 15					Total
	5	10	15	20	25	
Slope (%)						
1-10	1	11	13	6	1	32
11-20	0	13	19	8	0	40
21-30	1	13	16	7	0	37
31-40	3	10	17	4	0	34
41-50	2	5	8	2	1	18
51-60	2	7	6	0	0	15
> 60	2	12	5	0	0	19
Aspect						
N	2	11	10	4	0	27
NE	4	9	15	3	0	31
E	3	15	8	2	0	28
SE	1	7	9	4	1	22
S	1	8	15	4	0	28
SW	0	8	11	3	1	23
W	0	5	8	2	0	15
NW	0	8	8	5	0	21
Elevation (m)						
< 1051	6	27	23	9	1	66
1051-1250	2	22	27	6	1	58
1251-1450	1	5	16	4	0	26
1451-1650	0	9	5	6	0	20
> 1650	2	8	13	2	0	25
Totals	11	71	84	27	2	195

but is rather localized, and adjacent areas may receive very divergent amounts of rain in a given period. The highest average monthly temperature is 24°C in May and June. The lowest average monthly temperature of 17°C occurs in December.

MATERIALS AND METHODS

Plot selection

An ecological site classification was developed which stratified the study area into small homogeneous site units with closely defined landscape characteristics. Two hundred 0.4 ha sample plots were subjectively distributed over the study area in site units occurring on ignimbritic parent material. Plot size was chosen to more accurately describe the divergent site and stand conditions observed within the study area. Within each sample site, overstory and understory vegetation, soil type, slope position, and slope shape were nearly uniform. Furthermore,

selected sites were fully utilized by the trees and relatively free of recent disturbance such as logging, fire, or insect infestation. Plots were located to cover a wide range of aspects, slopes, and elevations; however, plot selection was not constrained by species composition, stand density, or age structure. At each plot, data were collected regarding the physical environment, understory vegetation, and stand characteristics.

Sample plots were located only in stands possessing suitable site trees of *Pinus oocarpa*. Suitable site trees were either codominant or dominant, and at least 15 years old at breast height. The trees had healthy-appearing crowns with no observable top damage, and no past history of suppression or damage as evidenced by increment cores taken at 1.3 m. Since *Pinus oocarpa* is shade intolerant, dominant and codominant trees should retain the same crown position throughout their lifetime, thus minimizing the chance of sampling trees with past suppression.

Stem analysis

Two site trees representative of the local growing conditions within the stand were felled on each plot. Site trees were cut with a 0.3 m stump, and sectioned at 0.8 and 1.3 m above the ground. Above 1.3 m, trees were cut into ten equal-length segments. Diameters (inside and outside bark) and height growth were measured, and rings were counted for all 12 sections.

Pine species which dominate the Honduran forests pose a special problem when evaluating site productivity because they do not always produce distinct annual growth rings (4). Often, two or more rings are produced in a given year due to two or more wet seasons separated by dry periods. Fires also influence ring production, for crown scorching may affect growth ring production for up to three years after fire. Thus upland pines in central Honduras may produce one or more or even no rings in a particular year. For this study, it was assumed that ring-counts recorded per section were equivalent to age.

Plot site index and height growth

Total height was plotted against breast height age for 402 stem-analysis trees. Tree records were deleted from subsequent analyses if plotted data indicated evidence of past suppression. This procedure reduced the total number of trees and plots to 389 and 195, respectively. The remaining stem-analysis trees averaged 20.7 m total height, 31.8 cm dbh, and 37 years of age at breast height. The range of measurements were

11.0 to 34.4 m, 16.1 to 78.1 cm, and 15 to 129 years. Of the 389 trees, 232 were classified as dominants and 157 codominants.

An average height growth curve was determined for each sample plot using the individual tree stem-analysis data and a Richards' function (5, 6):

$$HT = b_0 * [1 - \exp(-b_1 * A)]^{b_2} \quad (1)$$

where HT is total tree height minus 1.3 m, A is breast height age, exp is the base of natural logarithms, and b's are estimated by plot using derivative-free nonlinear regression (7). Equation 1 was then evaluated at index age 15 years to estimate plot site index. The number of sampled plots by 5 m site index class and levels of slope, aspect, and elevation are provided in Table 1. Index age was set to include trees from highly productive 15-year-old stands and to avoid extrapolation of equation 1 when determining plot site index. Age was referenced at breast height rather than the base of the tree to eliminate variability in early height growth due to the intensity and timing of such factors as climate, competition, fire, and grazing. The median number of years for *Pinus oocarpa* to reach breast height was 2, 3, 4, 5, and 6 years for site index class 25, 20, 15, 10, and 5 m, respectively. Equation 1 was also evaluated by five-year periods from age five to the five-year age class less than or equal to the youngest stem analysis tree on the plot. This procedure produced 1470 observations of total height, age, and site index by five-year age class for 195 plots.

A summary of stand and site variables for all 195 plots is given in Table 2. Data indicated a decline in observed plot site index with increasing average plot age. This apparent decline is due to better sites being harvested at younger ages; consequently, older stands are found only on the poorer sites. Therefore, observations with age equal to or greater than 50 years were omitted to eliminate the skewing effect of old stands found on poorer sites.

Polymorphic site index and height growth curves were fit with the remaining 1325 plot observations. Both models were constrained such that height equalled site index at index age. Heteroscedasticity was handled by using the inverse of the empirical residual variance for each five-year period as weights in iteratively re-weighted regressions (8). Final parameter estimates were obtained in three to four iterations when successive parameter estimates changed by less than one percent.

RESULTS AND DISCUSSION

Site index model

Several nonlinear model formulations were examined, but all performed poorly. Subsequently, a procedure first described by Dahms (9) and later modified by Monserud (10) was used to derive a linear site index model. First, plot site index was fit as a linear function of total height by five-year age class (11):

$$SI = b_0 + b_1 * HT \quad (2)$$

where HT and SI are defined as HT - 1.3 and SI - 1.3 m, respectively, and b_0 and b_1 are age-dependent parameters. Regressions by age class accounted for between 67% and 95% of the variability in observed site index. The standard error was 2.0 m at age five, declining to 0 m at 15 years (index age), and then gradually increasing to 1.5 m at age 50.

Mean height, mean site index, and b_1 from equation 2 were then expressed as functions of breast height age. Stepwise linear regressions, with observations weighted by the number of plots per five-year age class, were used to screen functions of age. The model formulation for predicting site index at any age was obtained by correcting equation 2 for the mean site index, and substituting age-specific equations for mean height and b_1 . Subsequently, the transformed equation 2 was fit as a function of total height and age.

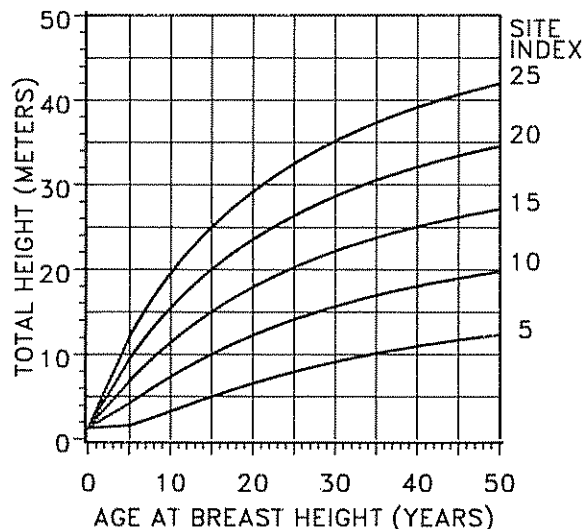


Fig. 2. Site index curves for *Pinus oocarpa* in the upland pine forests of central Honduras.

Table 2. Means and ranges for stand and site level variables.

Variable	Mean	Minimum	Maximum
Plot site index (m)	14	5	26
Plot age (yrs)	36	12	120
Basal area (m ² /ha)	22	6	40
Trees per hectare	536	71	1 374
Slope (%)	31	0	90
Elevation (m)	1 212	600	1 900
Soil depth (dm) ^a	9	1	15
Precipitation (mm) ^b	1 360	900	2 000
Temperature (°C)	20	17	24

a. Soil pits were dug to a 15 dm maximum depth.

b. Mean annual precipitation and temperature.

The modified Dahms' procedure produced the following site index model:

$$SI = 1.3 + HT + b_1 * [\ln(A)^2 - \ln(15)^2] + b_2 * [A * \ln(A) - 15 * \ln(15)] + b_3 * [(HT/A) - (HT/15)] \quad (3)$$

where SI is predicted site index in m, HT is total height minus 1.3 m, \ln is the natural logarithm, $b_1 = -0.76119$, $b_2 = 0.01473$, and $b_3 = 6.96787$.

The model explained 95% of the variability in site index, and had an unweighted 1.26 m standard error. Equation 3 is plotted as total height versus age at breast height for five site index classes in Fig. 2.

Residuals plotted by predicted 5 m site index class indicated significant but small (< 0.5 m) under- and overpredictions for the 5 and 20 m classes, respectively. The 25 m site class had a significant 2 m overprediction, which is most likely due to the lack of observations in the older age classes (12). A similar bias was observed for residuals by 5 m total height class. In this case, however, all mean absolute residuals were less than 0.5 m. Numerous functions of age and total height were attempted, but there was no significant improvement in observed bias for the site index model. Residuals plotted against other site and stand variables indicated that important predictor variables were not excluded from the model.

Groothusen (13) used a guide-curve technique and temporary sample plot (TSP) data to construct anamorphic height growth curves for *Pinus oocarpa* in Honduras. Comparisons with equation 3 produced expected results, in that Groothusen's curves were steeper at younger ages and flattened out more rapidly. Stem analysis data, along with polymorphic curve-fitting, reduce or eliminate these biases associated with anamorphic curves.

Height growth model

A logistic height growth model was fit after considering a modified Dahms' model and several alternative nonlinear model formulations. The resultant height growth model was:

$$HT = 1.3 + SI * \frac{1 + \exp[b_0 + b_1 * \ln(15) + b_2 * \ln(SI)]}{1 + \exp[b_0 + b_1 * \ln(A) + b_2 * \ln(SI)]} \quad (4)$$

where HT is the average height of codominant/dominants, SI is the observed plot site index minus 1.3 m, A is age at breast height. $b_0 = 6.75433$, $b_1 = -1.23093$, and $b_2 = -1.18605$. The fitted model explained 95% of the variability in height with an unweighted standard error of 1.27 m. Height growth curves are plotted against breast height age for five site index classes in Fig. 3. Residuals for the height growth model plotted against predicted height, age at breast height, and site index, revealed no problems with bias. Residuals plotted against other site and stand variables did not indicate that additional variables would improve model performance.

Further data analyses indicated that *Pinus oocarpa* height growth was not suppressed by increased stand density. To the contrary, significant positive correlations showed that higher site index values were associated with higher densities. This results suggests that factors such as precipitation and soil depth, which determine the site's innate productive capacity, were also influencing observed density.

Application

Differences between Figs. 2 and 3 illustrate the

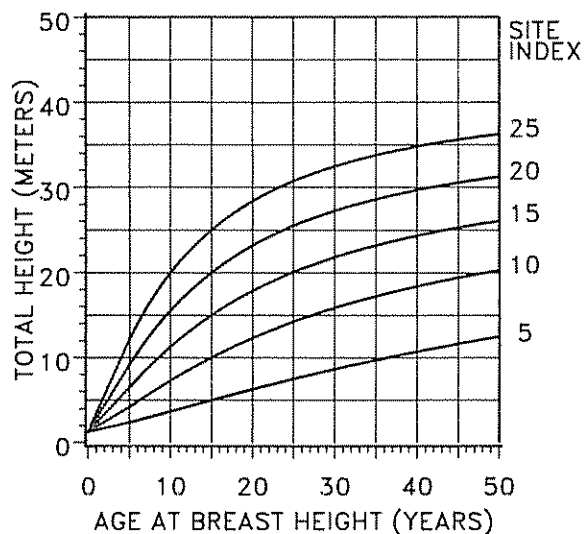


Fig. 3 Height growth curves for *Pinus oocarpa* in the upland pine forests of central Honduras.

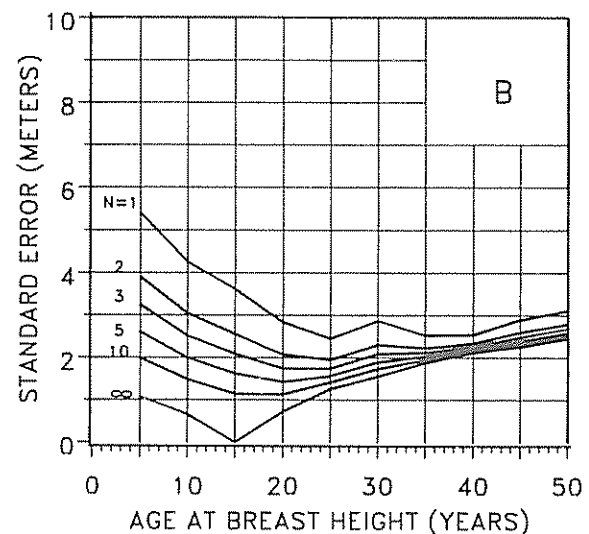
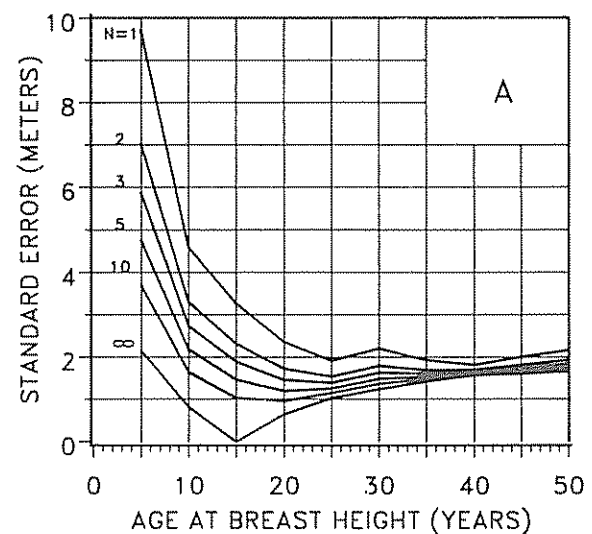


Fig. 4. Precision curves of the (A) site index, and (B) height growth equations for *Pinus oocarpa* in the upland pine forests of central Honduras.

behavior that Curtis *et al.* (2) and Monserud (10) described for a system of site index and height growth curves. As stated earlier, the models answer two different questions. For instance, the site curve labelled 25 (Fig. 2) passes through 40 m height at age 43 years. If a tree were sampled with that particular height and age, the best estimate of site index would be 25 m. However, 40 m trees were not observed during this study and are probably not in the population. An alternative objective would be to estimate the average height growth for codominant/dominant trees within a stand of known site index. In that case, Fig. 3 would provide an estimated 35 m height for a 43-year-old tree in a stand with a 25 m site index.

This estimate, which answers a different question, falls within the observed range of total height.

There will be error associated with applying the height growth and site index models, even if measurement error is ignored. This overall variance, or error resulting from variability unaccounted for by the models, arises from two sources: the error which was minimized for each of the 195 plots summarized with the Richards function; and the error which was minimized while fitting the height growth and site index models. Precision curves for calculating sample size for a desired standard error and known stand age were developed for the height growth and site index models (14).

The relationship between the overall error and sample size (n) as age varies from five to 50 years is illustrated in Figs. 4-A and 4-B. The precision curves are based on the sampling variability in the data per five year period. Values on the curves labeled $n = \infty$ are the overall errors associated with fitting the height growth and site index models. Site index or height estimates can be no more precise than these values, no matter how many trees are sampled on a plot. For example, it would be impossible to obtain a standard error of less than two meters when estimating site index with five-year-old trees. As expected, site index is more difficult to predict at ages less than 15 years. In comparison, height growth is more predictable at younger ages and less predictable as age increases.

The correct procedure for estimating site index or height growth depends on the methods used for constructing the curves (15). The following field procedures should be used for determining *Pinus oocarpa* site index in central Honduras:

1. First, determine the sample size (n) needed to attain a desired standard error using Fig. 4-A. For example, if a 1.5 m standard error is desired and

the average stand age at breast height was 20 years, then $n = 3$ site trees should be chosen. In all cases, account for site variability.

2. The sample plot should be selected to be representative of the growing conditions in the stand. Since site trees used for model development were selected at a rate of two per 0.4 ha or 5 per ha, then sample plot size should be $n/5$ ha. For example, if $n = 3$, then sample trees should be chosen on a plot of approximately 0.6 ha.
3. Codominant or dominant *Pinus oocarpa* site trees should be selected, which have healthy-appearing crowns and no visible top damage. Complete increment cores should be obtained at breast height (1.3 m) for each of the "n" site trees. Trees which show evidence of past suppression should be replaced in the sample.
4. Measure total height (to the nearest 0.1 m) and count the number of rings at breast height for the "n" sampled trees. Trees with breast height age greater than 50 years should be replaced in the sample. Site index should not be estimated for stands greater than 50 years old.
5. Site index is estimated for each site tree using either the site curves (Fig. 2) or equation 3, and plot site index is calculated as the average site index for the "n" sampled trees.

Height growth for codominant/dominant stands less than 50 years old is calculated using the above procedure, a known site index, Fig. 4-B, and either the height growth curves (Fig. 3) or equation 4. Any deviations from the prescribed application procedures listed above could result in significant errors (14, 15). Field testing indicates possible bias when applying the site index and height growth curves on soils other than ignimbrites.

LITERATURE CITED

- 1 STIFF, C.T.; PEREZ, D.N.; JOHNSON, F.D. 1987. Classification of the upland pine forests of central Honduras for site quality and productivity. In Land and resource evaluation for national planning in the tropics: Proceedings of the international conference and workshop. Ed. by H.G. Lund, M. Caballero-Deloya. Chetumal, Mexico, United States Department of Agriculture, Forest Service General Technical Report WO-39, p. 128-133.
- 2 CURTIS, R.O.; DeMARS, D.J.; HERMAN, F.R. 1974. Which dependent variable in site index-height-age regression? *Forest Science* 20:74-87.
- 3 CLEWELL, A.F. 1973. Floristic composition of a stand of *Pinus oocarpa* in Honduras. *Biotrópica* 5:175-182.
- 4 HUGHES, J.F. 1970. A preliminary investigation of some structural features and properties of the wood of *Pinus caribaea* from British Honduras. *Commonwealth Forestry Review* 49:336-355.

- 5 CURTIS, R.O. 1964. A stem-analysis approach to site-index curves. *Forest Science* 10:241-256.
- 6 RICHARDS, F.J. 1959. A flexible growth function for empirical use. *Journal of Experimental Botany* 10:290-300.
- 7 SAS INSTITUTE INC. 1982. SAS user's guide: statistics, 1982 edition. Cary, NC: SAS Institute Inc. 584 p.
- 8 DRAPER, N.R.; SMITH, H. 1981. Applied regression analysis 2 ed. New York. John Wiley 709 p.
- 9 DAHMS, W.G. 1975. Gross yield of central Oregon lodgepole pine. In Management of lodgepole pine ecosystems. Proceeding of a Symposium. Ed. by D.M. Baumgartner. Washington State University Co-operative Extension Service, Pullman, WA. p. 208-232.
10. MONSERUD, R.A. 1984. Height growth and site index curves for inland Douglas fir based on stem analysis data and forest habitat type. *Forest Science* 30:943-965.
11. HEGER, L. 1968. A method for constructing site index curves from stem analyses. *Forestry Chronicle* 44:11-15.
- 12 SMITH, V.G. 1984. Asymptotic site-index curves, fact or artifact? *Forestry Chronicle* 60:150-156.
13. GROOHOUSEN, C. 1980. Site index curves for *Pinus oocarpa* Schiede in Honduras. COHDEFOR Sección Manejo Forestal. Boletín Silvícola no. 3 5 p.
- 14 MONSERUD, R.A. 1985. Applying height growth and site index curves for inland Douglas-fir. United States Department of Agriculture. Forest Service Research Paper INT-347. 22 p.
- 15 CLUTTER, J.L.; FORTSON, J.C.; PIENAAR, L.V.; BRISTER, G.H.; BAILEY, R.L. 1983. Timber management: A quantitative approach. New York, John Wiley 333 p.

Soybean Root Growth and Nutrient Uptake as Affected by Lime Rates and Plant Age II. Ca, Mg, K, Fe, Cu and Zn¹

J.A. Martini*, R.G. Mutters*

ABSTRACT

A growth chamber study was conducted to determine the effect of lime rates and plant age on soil nutrient availability and nutrient uptake by a certain soybean cultivar (*Glycine max* Merr.). The experiment consisted of three lime rates and four plant ages in four randomized complete blocks. Shoot nutrient concentrations increased for Ca and Mg but decreased for K, Fe, Cu, and Zn, when lime was applied at the recommended rate. Lower shoot K concentrations as a result of liming were attributed to an antagonistic effect of Ca and Mg present in the soil. Liming at twice the recommended rate reduced shoot concentrations for all nutrients except Mg. Shoot nutrient concentrations, as a function of plant age, either increased, remained constant, or decreased slightly because of nutrient demands by the plant. An exception was Fe, which decreased considerably during the first four weeks. Nutrient uptake per meter of root generally followed a decreasing trend with plant age. These results were attributed to dilution by shoot growth and decreasing root activity. The decline in root activity was attributed to aging of roots and increasing length of young roots, which reduced the uptake demands by each meter of root. Nutrient uptake rates per meter of root related better to shoot nutrient concentrations than to shoot nutrient accumulation rates. Nutrient parameters of shoots generally increased with liming at the recommended rate. These increases were attributed to improved soil nutrient availability in the case of the macronutrients, and to longer and finer root systems in the case of macronutrients and micronutrients. Liming with twice the recommended rate generally depressed shoot nutrient parameters. These decreases were ascribed to small root systems in the case of macronutrients and micronutrients, and to limited soil nutrient supply in the case of the micronutrients.

INTRODUCTION

For plants to attain their genetic yield potentials, they must be grown under optimum environmental conditions, both above ground and in the soil. Among the most limiting soil factors are the

¹ Received for publication 28 May 1988.

Contribution from the Department of Agronomy and Soils, S.C. Agric. Exp. Sta. Journal Series No. 2388, Clemson University, Clemson, SC 29634-0359, USA.

* Professor and graduate Research Assistant, Department of Agronomy and Soils, Clemson University, Clemson, SC 29634-0359, USA.

COMPENDIO

Un estudio fue conducido en cámara de crecimiento para determinar el efecto del encalamiento y la edad de la planta sobre la disponibilidad de nutrimentos en el suelo y su absorción por una variedad determinante de soya (*Glycine max* Merr.). El experimento consistió de tres niveles de cal dolomítica y cuatro edades de la planta, con cuatro repeticiones en un diseño de bloques randomizados completos. La concentración de nutrimentos en el tallo aumentó para el Ca y Mg pero disminuyó para el K, Fe, Cu y Zn, debido al encalado recomendado. Cuando el encalado recomendado fue doblado, la concentración de nutrimentos disminuyó, con la excepción del Mg. La concentración de nutrimentos en el tallo, en función de la edad de la planta, tendió a disminuir para el Mg, K, Fe y Zn pero tendió a aumentar para el Ca y Cu. La absorción de nutrimentos por metro de raíz, generalmente, disminuyó con la edad. Estos resultados fueron atribuidos a la dilución debida al crecimiento del tallo y a la disminución de la actividad absorbente de las raíces. El decaimiento de la actividad radicular fue acreditada a la edad de las raíces y al aumento del largo de las raíces, lo cual redujo la necesidad de absorción por metro de raíz. Los parámetros pertinentes a los nutrimentos del tallo, generalmente, aumentaron con el encalado recomendado. Estos aumentos fueron atribuidos a una mayor solubilidad en el caso de los macro-nutrimentos, y a sistemas radiculares largos y finos en el caso de todos los nutrimentos.

stresses imposed by unfavorable soil conditions such as high acidity, low fertility and poor physical properties. These adverse conditions are detrimental not only to soil nutrient availability but also to root growth and development, perhaps the single most important factor in determining crop yields.

There are many soils in the southeastern United States which are acid, low in fertility, shallow, and underlain by acid and dense subsoils. Such conditions restrain root growth and nutrient uptake, and have motivated a great deal of research effort. Relationships among soil acidity, elemental toxicities, nutrient availability, liming and crop performance have been studied by Foy *et al.* (3, 8) Perkins *et al.* (20), Kamprath *et al.* (7, 12, 13), and Martini *et al.* (14, 15). The effects of soil properties on root growth and nutrient uptake have been scrutinized by Kamprath *et al.* (9, 22, 23), Brown *et al.* (10, 21), Scott and Brewer (24), Adams and Moore (2), Barber *et al.* (4, 6, 11, 18, 25, 28) and Martini *et al.* (16, 17).

The main objective of this investigation was to determine the effect of lime rates and time on soil nutrient availability and nutrient uptake by a determinate soybean cultivar (*Glycine max* Merr.). Root length, as opposed to root weight or volume, was selected as the most useful parameter to characterize root growth and its impact on nutrient uptake and shoot performance.

MATERIALS AND METHODS

A growth-chamber study was conducted with soil from the A horizon of a Cecil sandy loam (Typic Hapludult). A factorial design in four randomized complete blocks was used. The experimental factors were: three lime rates (0, 3 and 6 mg/ha) applied 2 weeks before planting and four plant ages (2, 4, 6, and 8 weeks after emergence). Three mg/ha was the recommended amount of lime based on the Adams-Evans buffer method (1). Dolomitic limestone with a 100% calcium carbonate equivalent was applied. All posts received 25 $\mu\text{g/g}$ of N, 100 $\mu\text{g/g}$ of P and 50 $\mu\text{g/g}$ of K, applied as 5-10-10 and 0-20-0 at planting time. Soil and materials were mixed in a twin-shell dry blender to insure uniform distribution. The treated soil was packed to a bulk density of approximately 1.15 g/cc in white plastic containers (PVC pipes) 10 cm in diameter and 60 cm deep. The soil columns were placed on sand-filled aluminum plates and maintained at or near field capacity with distilled water.

Inoculated Bragg soybean (*Glycine max*, Merr.) seeds were planted at the rate of eight seeds per pot and the seedlings were thinned to four plants per pot two days after emergence. The growth chamber was maintained at 27°C, 50% relative humidity, and 15 hours of light per day with an intensity of 2000 to 3000 cd.

Fresh roots were collected by wet-sifting the soil through stainless steel sieves. Root samples were washed with distilled water, blotted dry and weighed. Root volume was measured by water displacement in a graduated cylinder. The average root diameter was calculated from the volume equation for a cylinder ($V = \pi r^2 L$). Root length was determined by the root-line intersection method proposed by Newman (19) and Tennant (27), using the equation: $L = N (\pi A / 2H)$, where L = root length, N = number of intercepts (average of 50 readings), A = sieve area, and H = length of intercepting line. Nutrient influx in $\mu\text{mol/m}$ or root per day was calculated using the Williams equation (5, 29): $I = [(U_2 - U_1)/(t_2 - t_1)] [(1nL_2/L_1)/(L_2 - L_1)]$, where I = nutrient uptake

rate, U = nutrient in the plant, t = uptake time, and L = root length.

Soil analysis: Plant nutrients including Ca, Mg, K, Fe, Cu, and Zn were extracted with 40 ml of the Mehlich I solution (0.05 M HCl and 0.013 M H_2SO_4) from a 10 g soil sample (26) and measured by atomic absorption spectrophotometry.

Tissue analysis: one gram of finely ground plant tissue (whole shoots) was digested using the double acid (HNO_3 and HClO_4) method and nutrients determined by atomic absorption spectrophotometry.

RESULTS AND DISCUSSION

The effect of lime rates, as a function of time, on the various nutrient elements in the soil are depicted in Fig. 1. The results comply with the general trends reported in the literature cited. Liming at the recommended rate of 3 mg/ha (1X) promoted an increase of Ca and Mg up to week 6, relative to the no lime treatment (0X). The decline of Ca and Mg after week 6 was attributed to high plant uptake during the first six weeks and to some precipitation as phosphates (see Part I of this paper which appeared in Vol. 39(1), Fig. 3c). Liming with twice the recommended rate (2X) resulted in the highest soil Ca and Mg levels throughout the 8-week experiment. Soil K increased up to week 2, due to fertilization, and then decreased as a result of high plant uptake and possible interactions with the soil colloids. Liming at the recommended rate favored higher soil K availability. Soil Fe increased with time, while Cu and Zn

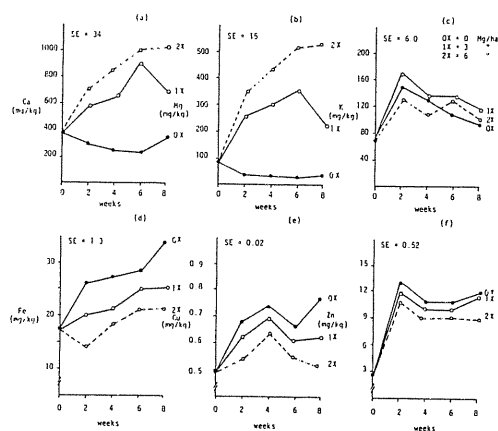


Fig. 1. Effect of lime rates and time on soil nutrient levels.

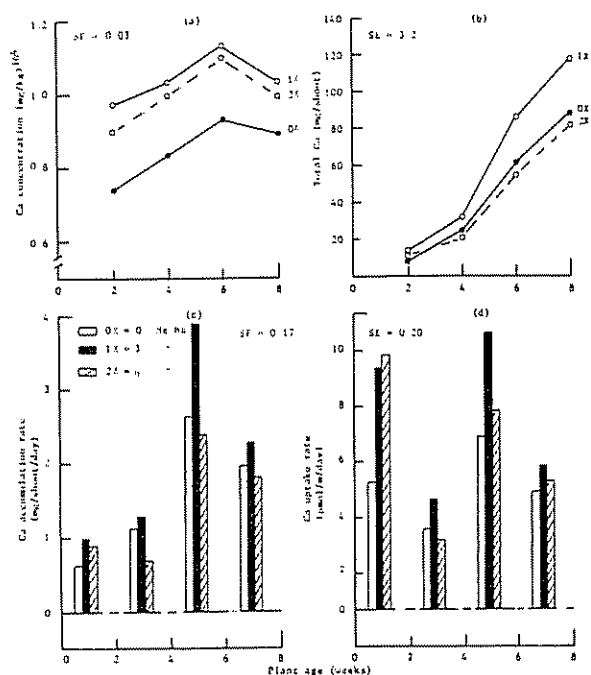


Fig. 2 Shoot Ca parameters as affected by lime rates and plant age.

increased and then decreased, mostly as a result of plant uptake. Liming reduced the availability of all three micronutrients

The effects of lime rates and plant age on the various shoot nutrient parameters are presented in Figs. 2 through 7. Shoot Ca concentrations (Fig. 2a) in the 1X treated pots were higher than in the unlimed pots, regardless of plant age, because of higher Ca availability (Fig. 1a) and longer, finer root systems (Part I, Fig. 1). Lower shoot Ca concentrations in the 2X pots, relative to the 1X treatment and despite higher soil Ca levels, were attributed to smaller root systems. Shoot Ca concentrations increased with plant age up to week 6 and then decreased, regardless of treatment. Shoot growth failed to dilute shoot Ca concentrations up to week 6. These results were related to high nutrient uptake rates (Fig. 2d), and fast growing root systems (Part I, Fig. 1). The reduction in shoot Ca concentrations after week 6 was ascribed to lower uptake rates, and larger shoots (Part I, Table 1).

Total shoot Ca (Fig. 2b) increased with plant age, regardless of treatment, particularly after week 4 because of the high shoot growth rates (Part I, Table 1) and high shoot Ca concentrations (Fig. 2a). Lower total shoot Ca was related to low soil Ca levels (Fig. 1a) and small root systems (Part I, Fig. 1) in the unlimed soils, and to small root systems in the 2X soils. Lower shoot weight (Part I, Table 1) was also a contributing factor in both cases

Shoot Ca accumulation (Fig. 2c) increased with age up to week 6, regardless of treatment, because of the high nutritional demands of the soybean plant and high root activity. The high Ca uptake rate per meter of root between weeks 4 and 6 (Fig. 2d), despite increasing root length (Part I, Fig. 1b), was associated with high root activity and large nutrient demands by the plant. The increase in shoot to root ratios with time (Part I, Table 2) in spite of increasing root length up to week 6 (Part I, Fig. 1b) was related to large nutrient demands and high root activity. The reduction in Ca uptake per meter of root after week 6 (Fig. 2d), despite no increase in root length (Part I, Fig. 1b), was attributed to lower nutrient demands (Fig. 2c), and to diminishing root activity associated with an aging root system and lower root growth rates (Part I, Fig. 1).

Shoot Mg concentrations (Fig. 3a) in the limed pots were higher than in the unlimed pots, regardless of plant age. Liming with twice the recommended rate did not have the detrimental effect on shoot Mg concentrations noted for Ca (Fig. 2a). Shoot Mg concentrations decreased slightly with plant age in the limed pots due to dilution by shoot growth. High plant demands for this nutrient minimized this dilution effect.

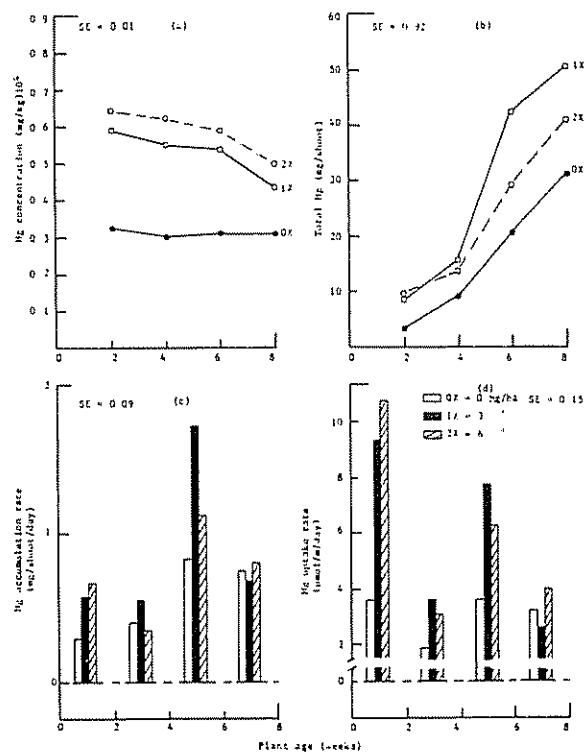


Fig. 3 Shoot Mg parameters as affected by lime rates and plant age.

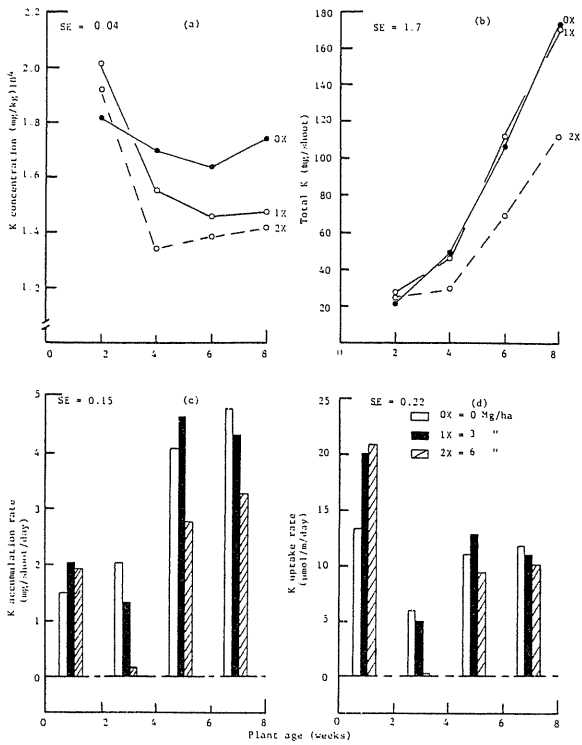


Fig. 4. Shoot K parameters as affected by lime rates and plant age.

Total shoot Mg (Fig. 3b) increased with plant age despite decreasing shoot Mg concentrations (Fig. 3a) because of fast shoot growth rates (Part I, Table 1). Liming favored total shoot Mg levels because of larger plants and higher soil Mg availability (Fig. 1b). Total shoot Mg in the 1X plants was higher than in the 2X plants despite lower shoot Mg concentrations (Fig. 3a) because of larger shoots (Part I, Table 1).

Shoot Mg accumulation (Fig. 3c) and uptake (Fig. 3d) paralleled the performance of shoot Ca. Liming favored these two parameters between weeks 0 and 2, and weeks 4 and 6, because of large plant nutrient demands, high root growth and activity, and ample Mg supply in the soil (Fig. 1b).

Shoot K concentrations (Fig. 4a) in the limed pots were lower than in the unlimed pots after week 3 because of reduced K uptake (Fig. 4d). The reduction in K uptake was attributed to the antagonistic effect of Ca and Mg ions present in the soil around the roots (rhizocylinder) and at the absorption sites on the roots. Calcium and Mg ions compete with K ions for space, both in the soil and on the roots. Shoot K concentrations decreased with plant age due to dilution by shoot growth and then increased by week 6 or 8 as a result of higher K uptake (Fig. 4d) under less

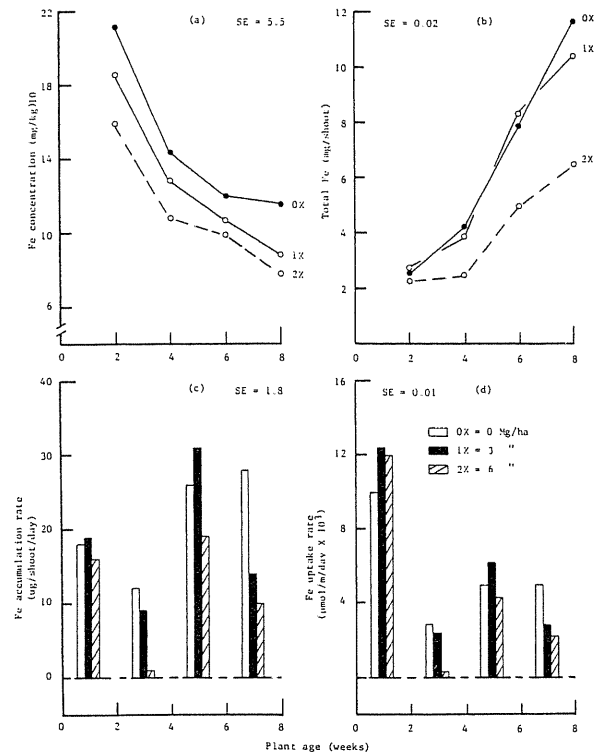


Fig. 5. Shoot Fe parameters as affected by lime rates and plant age.

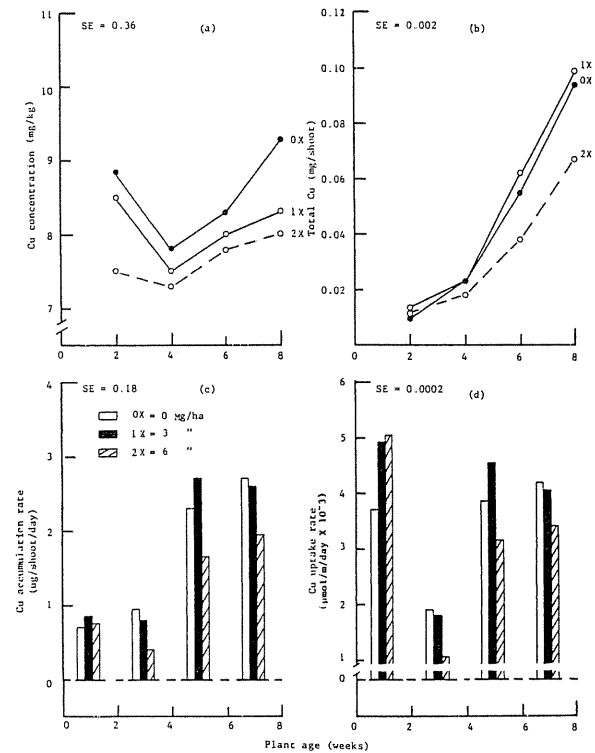


Fig. 6. Shoot Cu parameters as affected by lime rates and plant age.

Ca and Mg interference. Shoot K concentrations were lowest between weeks 4 and 6, despite high soil K supply (Fig. 1c), presumably because of high Ca and Mg uptake (Figs. 2, 3). Shoot K concentrations were more closely related to Ca and Mg parameters than to soil K availability.

Total shoot K (Fig. 4b) increased with plant age, despite some decrease in shoot K concentration. Total shoot K was reduced by overliming the soil due to lower shoot K concentrations (Fig. 4a) and smaller shoot weights (Part I, Table 1). These results were associated with lower K uptake (Fig. 4d) resulting from less roots (Part I, Fig. 1) and Ca-Mg antagonisms.

Shoot Fe, Cu, and Zn parameters (Figs. 5, 6, 7) performed similarly to those of previous nutrients in terms of plant age, and liming. Shoot nutrient concentrations were consistently lower with liming because of reduced nutrient solubility in the soil and lower uptake at higher soil pH values (Fig. 1). Shoot nutrient concentrations were not diluted appreciably by shoot growth because of high nutrient uptake. Shoot Fe concentrations were an exception in that they decreased considerably with plant age (Fig. 5a) because of decreasing Fe uptake (Fig. 5d), despite increasing soil Fe availability (Fig. 1d).

Total shoot Fe, Cu, and Zn (Figs. 5b, 6b, 7b) increased with plant age, regardless of lime treatment and shoot nutrient concentrations. These results were attributed to fast shoot growth rates, particularly after week 4 (Part I, Table 1). Total shoot nutrient levels were always lower in the 2X pots because of reduced nutrient solubility in the soil (Fig. 1), less root growth (Part I, Fig. 1) and lower nutrient uptake (Figs. 5d, 6d, 7d).

Shoot nutrient accumulation rates (Figs. 5c, 6c, 7c) were generally highest by week 6 or 8, regardless of lime treatment. Nutrient uptake rates per meter of root (Figs. 5d, 6d, 7d) generally decreased with plant age. The low uptake rates between weeks two and four were noted for all of the nutrient elements studied.

CONCLUSIONS

A difference in the performance of shoot parameters between nutrients and non-nutrients (Al) was established, based on plant requirements. When dealing with nutrient elements, plant demands were high

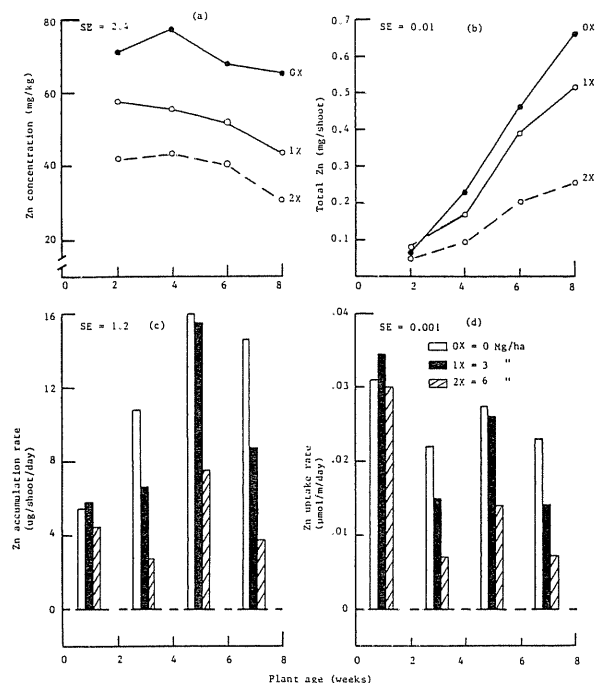


Fig. 7. Shoot Zn parameters as affected by lime rates and plant age.

and consequently nutrient uptake and concentration in the shoots increased, or remained constant. If a decrease occurred, it was not as drastic as with a non-nutrient.

Nutrient uptake per meter of root in the shoots generally followed a decreasing trend with plant age because of dilution by shoot growth and decreasing root activity. Lower root activity was attributed to aging of roots and increasing length of young roots which reduced the uptake demands by each meter of root. Nutrient uptake rates per meter of root related better to shoot nutrient concentrations than shoot nutrient accumulation rates.

Nutrient parameters of shoots generally increased with liming at the recommended rate. These results were related to increased soil nutrient availability in the case of the macronutrients, and to longer and finer root systems in the case of the macronutrients and micronutrients. Liming with twice the recommended rate generally depressed shoot nutrient parameters. These results were attributed to small root systems in the case of the macronutrients and micronutrients, and to limited soil nutrient supply in the case of the micronutrients.

LITERATURE CITED

- 1 ADAMS, F ; EVANS, C E 1962 A rapid method for measuring lime requirement of red-yellow podzolic soils *Soil Sci Soc Amer Proc* 26:355-357
- 2 ADAMS, F ; MOORE, B L 1983. Chemical factors affecting root growth in subsoil horizons of coastal plain soils *Soil Sci Soc Am J* 47:99-102.
- 3 ARMIGER, W H ; FOY, C D ; FLEMING, A L ; CALDWELL, B E. 1968 Differential tolerance of soybean varieties to an acid soil high in exchangeable aluminum. *Agron J* 60:67-70
- 4 BARBER, S A 1978, Growth and nutrient uptake of soybean roots under field conditions *Agron J* 70:457-461.
- 5 BREWSTER, J L ; TINKER, P B. 1972. Nutrient flow rates into roots. *Soils Fert.* 35:355-359
- 6 EDWARDS, J.H ; BARBER, S A. 1976 Phosphorus uptake rate of soybean roots as influenced by plant age, root trimming, and solution P concentration *Agron J* 68:973-975
- 7 EVANS, C E ; KAMPRATH, E J 1970 Lime response as related to percent Al saturation, solution Al, and organic matter content *Soil Sci Soc Amer Proc* 34:893-896.
- 8 FOY, C.D.; FLEMING, A L ; ARMIGER, W H. 1969 Aluminum tolerance of soybean varieties in relation to calcium nutrition *Agron J* 61:505-511.
- 9 HANSON, W D ; KAMPRATH, E J. 1979 Selection of aluminum tolerance in soybeans based on seedling-root growth *Agron J* 71:581-586
- 10 JONES, C.A ; REEVES, A ; SCOTT, J D ; BROWN, D A 1978. Comparison of root activity in vegetative and reproductive soybean plants *Agron J* 70:751-755
- 11 JUNGK, A.; BARBER, S A 1974 Phosphate uptake rate of corn roots as related to the proportion of the roots exposed to phosphate *Agron J* 66:554-557
- 12 KRAMPRATH, E J. 1970 Exchangeable aluminum as a criterion for liming leached mineral soils. *Soil Sci Soc Amer Proc* 34:252-254
- 13 KAMPRATH, E J 1971. Potential detrimental effects from liming highly weathered soils to neutrality *Soil and Crop Sci Soc FL Proc.* 31:200-203
- 14 MARTINI, J A ; KOCHHANN, SIQUEIRA, O J.; BORKERT, C M 1974 Response of soybeans to liming as related to soil acidity, Al and Mn toxicities, and P in some Oxisols of Brazil. *Soil Sci Soc. Amer Proc* 38:616-620
- 15 MARTINI, J.A ; KOCHHANN, R A ; GOMES, E.P ; LANGER, F. 1977. Response of wheat cultivars to liming in some high Al Oxisols of Rio Grande do Sul, Brazil *Agron J* 69:612-616
- 16 MARTINI, J.A ; MUTTERS, R.G 1985. Effect of lime rates on nutrient availability, mobility and uptake during the soybean growing season. I Al, Mn, and P. *Soil Sci* 139:219-226
- 17 MARTINI, J.A MUTTERS, R.G 1985 Effect of lime rates on nutrient availability, mobility and uptake during the soybean growing season. II. Ca, Mg, K, Fe, Cu, and Zn. *Soil Sci* 139:333-343
- 18 MENGEL, D B ; BARBER, S A. 1974 Rate of nutrient uptake per unit of corn root under field conditions. *Agron J* 66:399-402.
- 19 NEWMAN, E.I 1966 A method of estimating the total length of root in a sample *J Appl Ecol.* 3:139-145
- 20 PARKER, M.B.; HARRIS, H B ; MORRIS, H D ; PERKINS, H F. 1969. Manganese toxicity of soybeans as related to soil and fertility treatments *Agron J* 61:515-518.
- 21 SANDERS, J L ; BROWN, D A. 1976 Effect of variations in the shoot:root ratio upon the chemical composition and growth of soybeans *Agron J* 68:713-717
- 22 SARTAIN, J B ; KAMPRATH, E J 1975 Effect of liming a highly Al-saturated soil on the top and root growth and soybean nodulation *Agron J* 67:507-510.
- 23 SARTAIN, J.B.; KAMPRATH, E J. 1977. Effect of soil Al saturation on nutrient concentration of soybean tops, roots, and nodules. *Agron J* 69:843-845.
- 24 SCOTT, H D ; BREWER, D W. 1982 Characterization of nutrient transport coefficients in field-grown soybeans *Soil Sci Soc Am J* 46:988-1004
- 25 SILBERBUSH, M ; BARBER, S A 1983. Prediction of phosphorus and potassium uptake by soybeans with a mechanistic mathematical model *Soil Sci Soc. Am J* 47:261-265.
- 26 SOIL TEST GROUP 1974. Procedures used by state soil testing laboratories in the southern region of the United States. Southern Cooperative Series. Bulletin no. 190 p 23
- 27 TENNANT, D. 1975 A test of a modified line intersect method of estimating root length. *J Ecol.* 63:995-1001
- 28 WARNCKE, D.D.; BARBER, S.A. 1974. Root development and nutrient uptake by corn grown in solution culture *Agron J* 66:514-516
- 29 WILLIAMS, R.F. 1946 The physiology of plant growth with special reference to the concept of net assimilation rate *Ann Bot* 10:41-72

Normas de Manipulación y Uso del Paraquat por los Pequeños Productores de Maíz en Centroamérica¹

M.J. Whitaker*

ABSTRACT

In 1987, a survey was conducted of the standards which apply to the use of herbicides containing paraquat by small-scale corn farmers in selected regions of Guatemala, El Salvador and Honduras. The results highlighted the extent to which small-scale farmers have incorporated this product into their corn farming, demonstrating that, in general, they had not experienced serious problems related to exposure to the product and that they felt relatively secure in terms of the standards for its use. Nonetheless, the results show the importance of continuing with the education and training of small-scale farmers, and of teaching the correct way of carrying out this procedure in order to improve specific aspects of paraquat use.

INTRODUCCION

En muchos casos, el uso de los productos agroquímicos por los pequeños agricultores en los países tropicales, para el control de las malezas, enfermedades y plagas insectiles, constituye un elemento importante en el alza de la productividad agrícola y el nivel de vida del pequeño agricultor. Sin embargo, las circunstancias socioeconómicas estrechas de la mayor parte de las poblaciones de pequeños agricultores, sus limitaciones en cuanto a recursos y niveles de instrucción, así como el débil acceso a la información y al asesoramiento, han despertado la inquietud acerca de la adecuación de tal tecnología para los pequeños agricultores en los países tropicales, en especial si son o no capaces de usar los agroquímicos de manera segura y eficaz.

En realidad, debido a los beneficios que proporcionan, es probable que en el futuro haya un aumento del uso de los productos agroquímicos por los peque-

COMPENDIO

Durante el año 1987, se hizo una encuesta dirigida a los pequeños productores de maíz centroamericanos en regiones seleccionadas en Guatemala, El Salvador y Honduras, sobre las normas de uso de los herbicidas que contienen paraquat. Los resultados ponen de manifiesto hasta qué punto los pequeños agricultores han integrado el producto en el manejo del maíz; demuestran que en general, los pequeños agricultores no experimentan problemas graves asociados con la exposición al producto y se sienten bastante tranquilos en cuanto a las normas de su uso. Sin embargo, los resultados también destacan la importancia de proseguir la educación y formación de los pequeños agricultores e indican la forma de llevar a cabo este procedimiento, con el objeto de mejorar ciertos aspectos específicos de la manera de usar el paraquat.

ños agricultores. Por lo tanto, es importante que su uso sea difundido y respaldado por programas eficaces de educación y formación. Gran parte de la crítica que ha rodeado el uso de los productos agroquímicos por los pequeños agricultores ha sido fundada en incidentes aislados, a menudo causados por el mal uso del producto, en lugar de ser estudios sistemáticos del nivel general de las prácticas adoptadas por los pequeños agricultores. Está claro que tales estudios, y la información que se obtenga de ellos, son necesarios si los programas de educación y formación, así como las discusiones en cuanto a la conveniencia de la tecnología agroquímica para los pequeños agricultores en los países tropicales, han de tener fundamentos sólidos.

En 1987, en el marco de su programa de custodia de los productos, el ICI encargó un estudio independiente del uso de su herbicida que contiene paraquat, 'Gramoxone', entre los pequeños productores de maíz en ciertos países centroamericanos seleccionados: Guatemala, El Salvador y Honduras.

Población objeto del estudio

En Guatemala, El Salvador y Honduras, hay más de 640 000 pequeñas plantaciones de maíz, con una extensión de aproximadamente 1.3 millones de hectáreas y que sostiene a casi 4.5 millones de personas, es decir un 51% de la población rural total de dichos países (Cuadro 1). Al presente, el paraquat se usa en casi la tercera parte de dicha superficie.

1 Recibido para publicación el 10 de octubre de 1988.

El autor desea agradecer al ICI Panamericana S.A. su ayuda, y en especial a su personal en Honduras, El Salvador y Guatemala que prestó su valiosa cooperación para iniciar este proyecto. Asimismo, se reconoce con gratitud el profesionalismo de Sistemas Ltda, Guatemala, C.A. que llevó a cabo las entrevistas y el análisis de los datos, así como los consejos y la ayuda del Dr. P. Slade, Dr. M. Litchfield, Dr. N. Sabapathy, Sr. G. Allen y otros colegas.

* ICI Agrochemicals, Fernhurst, Haslemere, Surrey, GU27 3JE, Reino Unido.

Cuadro 1. Estimaciones de la población de pequeños productores de maíz en Guatemala, El Salvador y Honduras.

	Guatemala	El Salvador	Honduras	Total
Superficies nacionales de maíz* (miles de ha)	770.0	243.0	350.0	1 363.0
Tamaño medio de las plantaciones de maíz** (ha)	2.3	1.8	1.9	2.1
Número estimado de pequeños productores de maíz (miles)	335.0	135.0	184.0	654.0
Población equivalente estimada*** (miles)	2 345.0	945.0	1 288.0	4 578.0
Población agrícola total**** (miles)	4 346.0	2 095.0	2 545.0	8 983.0
(%de la población agrícola)	54.0%	45.0%	51.0%	51.0%

Fuentes:

* Anuario de la FAO, 1985

** Encuesta de los pequeños agricultores, 1987.

*** Suponiendo una familia típica de 7 personas (1 abuelo, 2 padres, 4 hijos)

**** Departamento de Estadística de las Naciones Unidas, 1986

Metodología

Después de discusiones con pequeños agricultores que utilizan el paraquat, se elaboró un cuestionario estructurado para cubrir todos los aspectos sobre el uso del producto. Entrevistas personales directas se celebraron durante los meses de mayo y junio de 1987. Las entrevistas duraban aproximadamente 90 minutos. Todo el trabajo en el terreno y el análisis de los resultados se llevaron a cabo por una compañía encuestadora independiente.

Debido a la forma irregular de desarrollo del mercado para el paraquat en Guatemala, El Salvador y Honduras, el enfoque de la encuesta se dirigió hacia las áreas donde existen altas concentraciones de pequeños productores de maíz que usan el paraquat. Se eligieron en cada país tres sitios típicos de la mayor parte de las áreas en que los pequeños productores de maíz utilizan el paraquat (Apéndice 1). La muestra total se presenta en el Cuadro 2.

Al no existir listas de pequeños productores de maíz en dichas áreas, era imposible adoptar procedimientos de muestreo estrictamente randomizados. En su lugar se emplearon métodos de muestreo por

cuotas, procurando obtener una buena cobertura geográfica dentro de cada sitio.

Los resultados obtenidos en los sitios muestreados en los países individuales han sido combinados y no se han aplicado transformaciones de ponderación. Las diferencias marcadas entre sitios, dentro del mismo país, se destacan en el texto. Sin embargo, se descubrió que en general habían variaciones mayores entre países que dentro de ellos.

RESULTADOS

Características de las pequeñas plantaciones de maíz de muestreo

Aunque el tamaño medio de las pequeñas plantaciones en Guatemala, El Salvador y Honduras variaba notablemente, la mayor parte de ellas tenían una superficie menor de 3.5 ha (Fig. 1). El maíz es el alimento básico primario más importante de estas familias rurales; de aquí la importancia de cultivarlo con éxito para su bienestar general.

Las restricciones sobre la disponibilidad del agua, debido a la altitud o la falta de riego, limitan a l ó

Cuadro 2. Estructura de la muestra global (número de muestras entrevistas).

Sitio	Guatemala	El Salvador	Honduras	
Escuintla	43	Cabañas	41	
Santa Rosa	39	Ahuachapán	43	
Chiquimula	38	Sonsonate	40	
TOTAL	120		124	
			Costa del Norte	43
			Comayagua	38
			Paraiso	40
			TOTAL	121

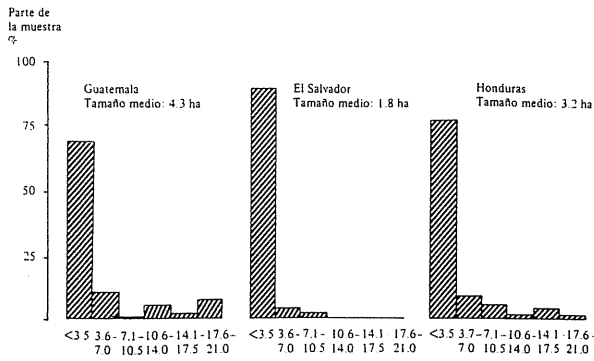


Fig. 1. Distribución por tamaño de las pequeñas plantaciones de maíz de muestreo.

2 cosechas por año, en la mayoría de las pequeñas plantaciones de maíz. Por lo general la primera siembra, la más importante, se hace en mayo-junio, y la segunda en agosto-setiembre. La importancia relativa de las dos siembras varía mucho entre los países incluidos en la encuesta, notablemente en El Salvador, donde gran parte de la producción de maíz está concentrada en la primera de las dos temporadas (Cuadro 3).

En la totalidad de la muestra, los pequeños agricultores dedican, un promedio del 60% de sus tierras al

Cuadro 3. Producción de cosechas múltiples de maíz por los pequeños agricultores entrevistados.

Núm. de cosechas de maíz/año	(Valores expresados en porcentaje de la muestra)		
	Guatemala	El Salvador	Honduras
1	39	98	60
2	59	2	40
3	2	—	—
TOTAL	100	100	100

cultivo del maíz. La mayor parte de ellos practican la interplantación de una parte de su maíz con una gran variedad de otros cultivos como el sorgo, frijoles, ajonjolí, calabazas, arroz, tomates o el segundo cultivo de maíz. Entre dichos cultivos, los que se interplantan más comúnmente son los frijoles y el sorgo, sobre todo en el primer y principal cultivo de maíz (Cuadro 4). De manera típica la interplantación se hace 1 ó 2 meses después de la siembra, o a los 4 meses, inmediatamente antes de la cosecha —al momento de la doblada— cuando las mazorcas de maíz se dejan secar en los tallos maduros del maíz.

Cuadro 4. Interplantación por los pequeños productores de maíz.

Sistema de cultivo del maíz		(Valores expresados en porcentaje de la muestra)		
		Guatemala	El Salvador	Honduras
I	Primer cultivo de maíz			
	sin plantación	—	—	—
	sin interplantación	44	30	35
	con interplantación	56	70	65
	TOTAL	100	100	100
% de pequeños agricultores que interplantan:	frijoles	17	34	55
	sorgo	28	40	10
	otros cultivos	24	14	11
	II	Segundo cultivo de maíz		
sin plantación	39	97	60	
sin interplantación	37	—	26	
con interplantación	24	3	14	
TOTAL	100	100	100	
% de pequeños agricultores que interplantan:	frijoles	12	1	8
	sorgo	5	2	—
	otros cultivos	10	—	7
	Número de respondientes(n)	(120)	(124)	(121)

Tradicionalmente, el control inicial de las malezas en el maíz se hace antes de la siembra, como consecuencia directa de la preparación del suelo, por lo general manualmente, con azadones o machetes. Desmalezados manuales entre las hileras suelen seguir este control inicial, el primero aproximadamente 20 días después de la emergencia del maíz y el segundo 30 a 60 días después de la emergencia, a menudo antes de la interplantación se hace al momento de la doblada, puede ir precedida de un tercer desmalezado entre las hileras, según la cantidad de maleza.

2. Integración del paraquat en el sistema de cultivo del maíz por los pequeños agricultores

Los resultados de la encuesta subrayan el punto hasta el cual los pequeños agricultores han integrado el paraquat en todas las fases de la práctica tradicional de control de las malezas (Cuadro 5). De forma típica se hacen 1 ó 2 aplicaciones en cada cultivo de maíz, no sólo antes o al momento de la siembra sino también, y extensamente, para el control de las malezas entre las hileras.

Las conversaciones con los pequeños productores de maíz, antes de la encuesta, descubrieron el punto hasta donde la polivalencia técnica del paraquat.

sobre todo su rápida acción de contacto y su falta de efecto residual, había permitido a los pequeños agricultores integrarlo totalmente en las prácticas tradicionales de control de las malezas en el maíz. Asimismo, hicieron resaltar el punto hasta el cual los ahorros de gastos y trabajo asociados con el uso del paraquat habían motivado su adopción, no sólo en el maíz sino también en muchos otros productos cultivados en las pequeñas plantaciones de maíz (ejemplo: frijol, café, cacao). Los costos comparativos y las ventajas de los ahorros de trabajo proporcionados por el control de las malezas con paraquat, frente a los métodos alternativos de control de las malezas comúnmente empleados por los pequeños agricultores en el maíz, se ilustran en el Cuadro 6.

3. Manera de ver y usar el paraquat por parte de los pequeños productores de maíz

Está claro que donde los pequeños agricultores hayan decidido usar el paraquat como herbicida en el maíz o cualquier otro cultivo, es importante que lo hagan sin poner en peligro ni su propia salud, ni la de su familia, ni el medio ambiente en que viven. El resto de la presente comunicación se dedica a los aspectos de seguridad del uso del paraquat.

Cuadro 5. Número y época de las aplicaciones de paraquat.

		(Valores expresados en porcentaje de la muestra)		
		Guatemala	El Salvador	Honduras
I	Número de aplicaciones por cosecha de maíz			
	1x	63	36	73
	2x	31	59	25
	3x	5	5	2
	4x	1	—	—
	TOTAL	100	100	100
II	Epoca de aplicación			
	I Pre-siembra	20	44	30
	II Post-siembra, pre-emergencia del maíz	26	17	9
	III Post-emergencia temprana (hasta 20 días)	30	15	33
	IV Mucho post-emergencia tarde (30-60 días)	13	8	12
	V Mucho post-emergencia tarde (30-60 días) antes de la interplantación	7	4	11
	VI Pre-cosecha (al momento de la dobla) antes de la interplantación	4	12	5
	TOTAL	100	100	100
	Número de respondientes(n)	(120)	(124)	(121)

NOTA: Ya que la forma de uso era parecida tanto en el primer cultivo de maíz como en el segundo, los resultados obtenidos en ambos cultivos se han combinado y expresado como porcentaje del total de las aplicaciones hechas por los agricultores entrevistados.

Cuadro 6. Comparación del costo de los métodos alternativos de control de las malezas en el maíz.

I	<p>Arada con bueyes</p> <p>La mayor parte de los pequeños productores de maíz no son propietarios de bueyes. Por lo tanto, cuando se hace la arada, de forma típica se contrata una yunta de bueyes. Su uso es poco frecuente y poco difundido ya que los pequeños agricultores lo estiman tanto caro como inconveniente en muchas de las tierras empinadas y pedregosas en que se cultiva gran parte de su maíz. Estimación del costo: US\$70 por ha y por pasada.</p>
II	<p>Desmalezado manual</p> <p>El uso de la mano de obra asalariada para el desmalezado manual con la azada o el machete es muy difundido en todas las plantaciones de maíz salvo las más pequeñas. Estimación del costo: US\$46 por ha y por pasada.</p>
III	<p>Aplicación de herbicidas</p> <p>(a) Atrazina Se usa en forma extensiva por los pequeños productores de maíz y a menudo se aplica mezclada con paraquat. Estimación del costo: US\$16 por ha y por aplicación – basada en una dosis de 2 kg/ha y un precio unitario de US\$8 por kg.</p> <p>(b) Paraquat Estimación de costo: US\$9 por ha y por aplicación – basada en una dosis de 1.5 l/ha y un precio unitario de US\$6.0 por litro.</p>

Nota: Al costo de aplicación de ambos herbicidas hay que agregar:

- (1) los gastos de alquiler de una asperjadora, de aproximadamente US\$4 por ha y por pasada, suponiendo un ritmo de trabajo de dos días de hombre por ha y un alquiler de US\$2.00 por día, o
- (2) si el agricultor es dueño de la asperjadora, la depreciación y los gastos de reparación y mantenimiento es de aproximadamente US\$3 por ha y por pasada, con base en un precio de compra de la asperjadora de US\$90.00, depreciado sobre un período de 5 años; un tipo de interés del 15% por año sobre el capital medio invertido; gastos anuales de reparación y mantenimiento calculados nominalmente en un 8% del precio de compra, y un promedio de 3.0 ha de maíz cultivado por año, con tres aplicaciones por año.

3.1 Tiempo durante el cual los pequeños agricultores han usado el paraquat

La mayor parte de los pequeños agricultores entrevistados usaban el paraquat desde hacía más de cinco años, lo que indica un nivel significativo de experiencia del producto; sin embargo, había variaciones notables entre los países (Fig. 2):

3.2 Concepto de la toxicidad del paraquat que tienen los pequeños agricultores

El buen uso del paraquat, incluso de forma intensiva, no presenta ningún peligro de intoxicación (1, 2). Pese a ello, existe un peligro grave de intoxicación mortal si el producto se traga, deliberadamente o por inadvertencia. Es importante que los usuarios de paraquat reconozcan esta característica del producto, para que se manipule con la debida precaución y se evite el peligro.

La encuesta exploraba el concepto que tienen los pequeños agricultores de la toxicidad del paraquat si se traga. Se demostró que los pequeños productores

de maíz están muy bien enterados de las consecuencias de tragar el producto. A la pregunta directa: “Qué piensa usted que sucedería a una persona que ingeriera una cantidad de paraquat, incluso una pequeña cantidad, por ejemplo un trago?”, se obtuvieron respuestas que indicaban claramente que la mayoría de los pequeños agricultores se daban cuenta de las consecuencias potencialmente mortales (Cuadro 7).

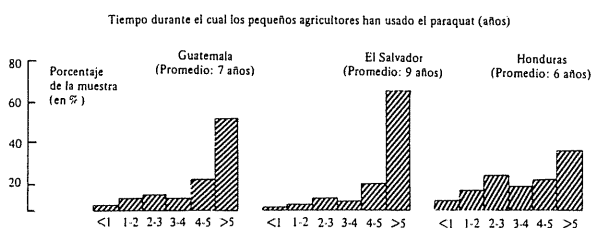


Fig. 2. Distribución del tiempo durante el cual los pequeños agricultores centroamericanos han usado el paraquat.

Cuadro 7. Porcentaje de pequeños productores de maíz que se dan cuenta de las consecuencias de tragar el paraquat.

Respuestas de los agricultores		(Valores expresados en porcentaje de la muestra)		
		Guatemala	El Salvador	Honduras
I	La persona moriría	80	96	89
II	La persona se pondría gravemente enferma	13	—	9
III	Pocos o ningunos efectos nocivos	3	1	—
IV	No sabe	4	3	2
Total		100	100	100
Número de respondientes (n)		(120)	(124)	(121)

A pesar de la naturaleza tranquilizadora de estos hallazgos, la ignorancia de las consecuencias del mal uso del paraquat, aunque a niveles muy bajos, hace resaltar la importancia de continuar los programas de educación y formación de los pequeños agricultores.

Un malentendido por parte de los pequeños agricultores, puesto de relieve por la encuesta, es la diferenciación errónea que hacen entre los niveles de peligro asociados con la manipulación del paraquat concentrado durante la mezcla, y la aplicación por aspersión del producto diluido. Es más importante evitar la contaminación por el producto concentrado durante la mezcla que la contaminación que pueda tener lugar durante la aplicación del producto diluido (1)

No obstante, el Cuadro 8 demuestra que muchos pequeños agricultores tienen la impresión corriente, pero errónea, de que la aspersión es más peligrosa que la manipulación del producto concentrado

3.3 Personas que mezclan y aplican el paraquat

La mayor parte de la mezcla y aplicación del paraquat, en las pequeñas plantaciones de maíz, se hace por la misma persona, a saber el jefe de familia, ayudado a veces por sus hijos adultos y trabajadores asa-

lariados (Cuadro 9). Los niños no participan de manera significativa en tales actividades.

3.4 Datos de base sobre la toxicología de paraquat

Para la evaluación de la admisibilidad o no de las normas de mezcla y aplicación del paraquat de los pequeños agricultores, es importante comparar la práctica adoptada con las características toxicológicas conocidas del producto. Dichas características han sido estudiadas a fondo por varios autores, entre ellos Hart (2). Las características toxicológicas claves del paraquat, que determinan las precauciones requeridas durante su uso, se resumen a continuación

- i Hay muy poco peligro de que el usuario de paraquat experimente una exposición significativa por inhalación, debido a la respiración del vapor o una nube de gotas durante el uso normal del producto; como por ejemplo, la aplicación con una mochila manual, y tal exposición carece de significado toxicológico. Por lo tanto, los usuarios de paraquat no tienen que usar una máscara durante la manipulación del producto concentrado, ni tampoco durante la aspersión de la forma diluida.
- ii La piel es la vía más probable de contaminación significativa por paraquat en las condiciones de

Cuadro 8. Concepto de la fase de manipulación y aplicación del paraquat durante la cual es más importante evitar el contacto con el producto.

Respuestas de los agricultores		(Valores expresados en porcentaje de la muestra)		
		Guatemala	El Salvador	Honduras
I	Durante la mezcla del concentrado	53	65	40
II	Durante la aspersión	42	28	58
III	No saben	5	7	2
Total		100	100	100
Número de respondientes (n)		(120)	(124)	(121)

Cuadro 9. Personas que mezclan y aplican el paraquat en las pequeñas plantaciones de maíz.

Personas que desempeñan la actividad		(Valores expresados en porcentaje de la muestra)					
		(A) Mezcla del concentrado de paraquat			(B) Aplicación del paraquat diluido		
		Guatemala	El Salvador	Honduras	Guatemala	El Salvador	Honduras
I	El jefe de familia	87	96	98	85	94	93
II	Su esposa	—	—	—	—	—	—
III	Hijo adulto	5	3	—	5	4	2
IV	Hija adulta	—	—	—	1	—	—
V	Niños	—	—	—	1	—	—
VI	Trabajadores asalariados	8	1	2	8	2	6
VII	Otros	—	—	—	—	—	—
	Total	100	100	100	100	100	100
Núm. de respondientes (n)		(120)	(124)	(121)	(120)	(124)	(121)

campo. No obstante, ha sido demostrado que la piel humana forma una barrera muy buena a la absorción del paraquat dentro del cuerpo, siempre que se usen medidas higiénicas adecuadas, por ejemplo el lavado, para evitar el contacto prolongado con el producto, sobre todo en su forma concentrada.

- iii Es posible que se experimenten lesiones de poca importancia y reversibles de la piel, los ojos, la nariz y las uñas, probablemente como consecuencia de una exposición excesiva a la formulación concentrada de paraquat. Por lo tanto, resulta deseable evitar el contacto prolongado con el paraquat concentrado, usando guantes de hule y una protección ocular durante la mezcla del producto concentrado y lavándose después de efectuar la mezcla. Sin embargo, queda bien establecido que el uso prolongado y frecuente del paraquat no tiene efectos graves de larga duración (1, 2, 3)

3.5 Normas de mezcla del paraquat observadas por los pequeños agricultores

Los resultados de la encuesta sugieren que al usar el paraquat, los pequeños agricultores practican medidas adecuadas de higiene personal. En contestación a la pregunta: "¿Qué medidas practica usted después de mezclar el paraquat?", la mayor parte de los pequeños agricultores en los tres países dijeron que se lavaban las manos, hubiera habido derrames o no (Cuadro 10). Incluso, después de tener en cuenta la deformación producida por las respuestas, parece existir una comprensión muy difundida entre los pequeños agricultores de la necesidad de mantener normas adecuadas de higiene personal al manipular el paraquat concentrado.

Los pequeños productores de maíz no suelen usar guantes de hule ni protección ocular (ni siquiera espejuelos) durante la mezcla del paraquat concentrado.

Cuadro 10. Prácticas de higiene personal adoptadas por los pequeños productores de maíz después de mezclar el paraquat concentrado.

Respuestas de los agricultores		(Valores expresados en porcentaje de la muestra)		
		Guatemala	El Salvador	Honduras
I	Siempre se lavan las manos, haya habido o no un derrame	97	88	93
II	Sólo se lavan las manos si hay un derrame	2	7	6
III	Nunca se lavan las manos	1	5	1
	Total	100	100	100
Número de respondientes (n)		(120)	(124)	(121)

Cuadro 11. Protección de las manos y ojos durante la mezcla del paraquat.

		(Valores expresados en porcentaje de la muestra)						
		A. MANOS			B. OJOS			
		Guatemala	El Salvador	Honduras	Guatemala	El Salvador	Honduras	
I	Los pequeños agricultores, ¿usan guantes de hule o protección ocular*?	SI	13	7	13	11	10	7
		NO	87	93	87	89	90	93
		TOTAL	100	100	100	100	100	100
Número de respondientes (n)		(120)	(124)	(121)	(120)	(124)	(121)	
II		Motivos de no usar guantes de hule o protección ocular						
Caros		28	44	44	26	53	42	
Molestos		3	2	10	3	1	7	
No hacen falta, ningún problema		56	24	27	30	21	27	
No se pueden comprar		3	1	6	1	—	4	
No se les ha advertido de su uso		9	15	7	13	14	17	
Gasto superfluo		3	5	2	1	6	3	
Otros		25	13	20	26	6	20	
Número de respondientes (n)		(104)	(115)	(105)	(107)	(112)	(112)	

Nota: *incluye la protección ocular proporcionada por los espejuelos

(Cuadro 11). Los motivos expuestos para no usarlos fueron el costo de los guantes y de la protección ocular; y el concepto de que no eran necesarios porque a los pequeños agricultores no les había traído problemas la mezcla del paraquat. Una vez más, este hallazgo hace resaltar la necesidad de continuar la educación y formación, con el objeto de ampliar la conciencia de lo que se consideran buenas prácticas y por lo tanto de mejorar las normas.

La mayoría de los pequeños agricultores dijeron que no habían recibido ningunas salpicaduras de paraquat concentrado en las manos o el cuerpo, ni tampoco en los ojos, durante los cinco años antes de ser entrevistados. Como era de esperar por la naturaleza del trabajo y los estudios sobre la exposición de los trabajadores de campo realizados en otras partes, la mayoría de las salpicaduras de producto concentrado cayeron en las manos (Cuadro 12).

Resultados adicionales demostraban que había un alto nivel de conciencia de las medidas a tomar en caso de derrame, como lavarse inmediatamente o cuanto antes. Preguntas suplementarias hechas a los que contestaban que "se lavarían cuanto antes" (o lo habían hecho), demostraban que la mayoría de las veces "cuanto antes" significaba pasados menos de 10 minutos.

3.6 Normas de aplicación de paraquat

Todos los pequeños agricultores entrevistados utilizaban mochilas manuales. Ninguno de ellos aplicaba el paraquat por medio de atomizadores motorizados. De manera típica, la ropa usada durante la aplicación del paraquat consistía en una camisa de mangas largas, un pantalón largo y botas o zapatos de hule (Cuadro 13), lo que es perfectamente adecuado para la aplicación del paraquat diluido. Sólo en Guatemala se reportaron casos de 'aplicación descalza'.

Como promedio, la mayoría de los pequeños agricultores poseían dos camisas, dos pantalones y un par de botas que usaban para las labores agrícolas generales y la aplicación. Además, parecía existir un reconocimiento difundido de la necesidad general de lavar la ropa, una vez terminada la aplicación (Cuadro 14). Este hallazgo apoya la impresión global obtenida en la encuesta, es decir que los pequeños agricultores, lejos de descuidar la seguridad, en realidad manipulan con prudencia el paraquat (e implícitamente los demás agroquímicos).

Esta opinión está apoyada por resultados adicionales de la encuesta. Se observa que los pequeños agricultores suelen lavarse inmediatamente, o tan pronto como sea posible, después de terminada la aplicación (Cuadro 15).

Cuadro 12. Salpicadura de concentrado de paraquat y medidas remediadoras tomadas.

		(Valores expresados en porcentaje de la muestra)					
		A. MANOS			B. OJOS		
		Guatemala	El Salvador	Honduras	Guatemala	El Salvador	Honduras
I	¿Había habido contaminación?						
	SI	21	23	17	5	3	1
	NO	79	77	83	95	97	99
	TOTAL	100	100	100	100	100	100
II Medidas remediadoras que tomarían o habían tomado							
	Lavarse inmediatamente	62	58	75	22	19	22
	Lavarse cuanto antes	11	10	6	—	—	—
	Tomar baño	3	—	2	—	—	—
	Lavarse e ir al médico	—	—	—	50	41	68
	Ir al médico	23	19	5	25	38	8
	No hacer caso y lavarse al fin del día	1	9	7	—	—	—
	Otras respuestas	—	4	5	—	2	2
	Total	100	100	100	100	100	100
	Número de respondientes (n)	(120)	(124)	(121)	(120)	(124)	(121)

Cuadro 13. Ropa usada en diferentes partes del cuerpo durante la aplicación del paraquat.

		(Valores expresados en porcentaje de la muestra)		
Parte del cuerpo	Prenda	Guatemala	El Salvador	Honduras
I	Parte superior del cuerpo y brazos			
	Ninguna	—	—	—
	Camisa de mangas largas	59	84	92
	Camisa de mangas cortas	28	17	26
	Camiseta	10	—	7
	Otras	3	1	17
II	Manos			
	Ninguna	89	95	86
	Guantes de hule	6	4	9
	Guantes de algodón	3	—	3
	Otras	—	1	1
III	De la cintura a los pies			
	Ninguna	—	—	—
	Pantalón largo	86	99	98
	Pantalón corto	1	—	2
	Calzoncillos y pantalón	38	12	51
	Otras	3	1	2
IV	Pies			
	Ninguna	19	—	—
	Botas de hule	45	27	44
	Zapatos de hule	10	27	19
	Botas de cuero	6	13	17
	Zapatos de cuero	14	33	26
	Sandalías	3	—	2
	Calcetines y zapatos	8	3	12
	Otras	4	—	—
Número de respondientes (n)		(120)	(124)	(121)

Cuadro 14. Momento de lavado de la ropa usada durante la aplicación.

		(Valores expresados en porcentaje de la muestra)		
		Guatemala	El Salvador	Honduras
I	Terminada cada día de la aplicación	36	41	50
II	Terminada toda la aplicación	42	32	31
III	Sólo al lavar rutinariamente la ropa de trabajo	22	27	19
	Total	100	100	100
Número de respondientes (n)		(120)	(124)	(121)

3.7 Incidencia de efectos sobre el cuerpo atribuidos por los pequeños agricultores al uso del paraquat

Las prácticas higiénicas inadecuadas y el contacto prolongado con el paraquat, particularmente la formulación concentrada, puede conducir a lesiones poco importantes y reversibles de la piel, los ojos, la nariz y las uñas. Por lo tanto, era importante investigar el grado de experiencia de tales efectos por parte de los pequeños productores de maíz centroamericanos.

A los agricultores se les preguntó qué efectos sobre el cuerpo habían experimentado durante el tiempo de uso del paraquat y que asociaban con la mezcla o aplicación del paraquat. Los resultados, a pesar de ser acumulativos en el tiempo, basados en el autodiagnóstico y sujetos a la información por los respondientes, demuestran que la mayoría de los pequeños agricultores en cada país no habían experimentado ningún efecto que se pudieran atribuir al uso del paraquat (Cuadro 16). Como se esperaba, la mayor parte de los efectos notados tenían niveles de incidencia relativamente bajos y se concentraban en las manos, los brazos y la espalda.

Por lo tanto, los efectos nocivos notados eran poco frecuentes y leves. Esto no es de extrañar, tomando

en cuenta que los pequeños productores de maíz sólo usan el producto por períodos relativamente breves durante el año (por lo general no más que algunos días), aplicando pequeñas cantidades (aproximadamente cinco litros/aplicación) en forma diluida.

Según la literatura citada (Parte 3.4), no se presenta ningún efecto nocivo incluso cuando se hace un uso mucho más intensivo del paraquat. Sin embargo, el hecho de que leves lesiones se presenten a veces, reafirma la necesidad de proseguir los esfuerzos por reducir su incidencia, por medio de programas apropiados de educación y formación de los pequeños agricultores.

Un requisito previo del uso seguro del paraquat es el grado de concentración aplicado. Se recomienda que las concentraciones del paraquat diluido no sean superiores a 1 parte por cada 40 partes de agua. Las diluciones se evaluaron en el curso de la encuesta realizada en 1987. En la Fig. 3 se ve que la mayoría de ellas quedan muy inferiores a la concentración máxima de 1:40. Sin embargo, aun tomando en cuenta la posibilidad de la evaluación errónea de la concentración, el hecho de que una proporción reducida de los pequeños agricultores parece aplicar el paraquat en concentraciones próximas a 1:40, revela la necesidad de continuar los programas de educación y formación.

Cuadro 15. Momento de lavarse después de la aplicación.

		(Valores expresados en porcentaje de la muestra)		
		Guatemala	El Salvador	Honduras
I	Inmediatamente después de terminada la aplicación	80	87	89
II	Tan pronto como posible después de terminada la aplicación	12	3	5
III	Sólo al acostarse	3	2	1
IV	No se lava del todo	—	3	—
V	Otros	5	5	5
	Total	100	100	100
Número de respondientes (n)		(120)	(124)	(121)

Cuadro 16. Incidencia de efectos nocivos atribuidos por los pequeños agricultores al uso de paraquat.

		(Valores expresados en porcentaje de la muestra)			
		Guatemala	El Salvador	Honduras	
I	Los pequeños agricultores, ¿habían experimentado efectos nocivos?	NO	92	81	85
		SI	8	19	15
		100	100	100	
II	Ubicación de los efectos nocivos notados:				
	Manos y brazos	4	11	7	
	Uñas	—	2	1	
	Esplada	1	10	6	
	Ojos	2	1	—	
	Otros	1	2	3	
Número de respondientes (n)		(120)	(124)	(121)	

Nota: Ya que los pequeños agricultores no diferenciaban de manera muy clara entre los efectos nocivos atribuibles a la manipulación del concentrado y los atribuidos a la aplicación de la solución diluida, los resultados se han combinado, cubriendo ambas actividades.

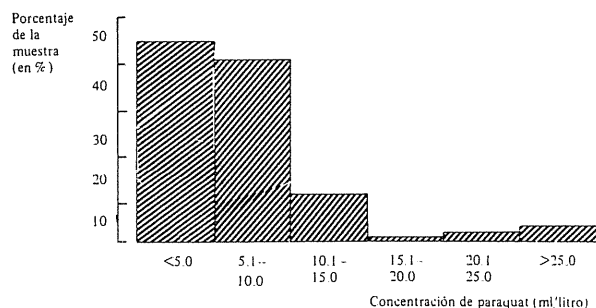


Fig. 3. Concentración medida del paraquat aplicado por pequeños productores de maíz.

3.8 Almacenamiento del paraquat por los pequeños productores de maíz

Al igual que los pequeños agricultores en la mayor parte de los países, los pequeños productores de maíz centroamericanos tienden a comprar pequeñas cantidades de paraquat, lo suficiente para una sola aplicación. La mayoría de los pequeños agricultores, salvo los de El Salvador, dijeron que compraban la suficiente cantidad para una aplicación, lo que refleja la forma de usar el producto (Parte 2 más arriba). Es de esperar por lo tanto, que la mayoría de los pequeños agricultores no guarden ningún paraquat de una temporada a la próxima. Los resultados de la encuesta confirman esta suposición (Cuadro 17).

Los métodos de almacenamiento del paraquat, e implícitamente los demás agroquímicos, en las pequeñas plantaciones de maíz, son en gran parte improvisados. Está claro que tales métodos podrían mejorarse mucho, pero la mayoría de los pequeños agricultores se dan cuenta de la necesidad de guardar los agroquí-

micos de manera segura y tratan de encontrar sitios que estiman seguros para su almacenamiento. Es así como la mayoría de los pequeños agricultores opinaron que guardan el paraquat en un sitio elevado, o en un cobertizo apartado de la casa (Cuadro 18).

Preguntados por qué habían elegido el sitio de almacenamiento en cuestión, las respuestas de los pequeños agricultores indican un alto nivel de conciencia de la necesidad de almacenar el paraquat con precaución, debido a su toxicidad, y de ahí la necesidad de almacenarlo a distancia de los miembros de la familia y sobre todo de los niños (Cuadro 19). Dichas respuestas sugirieron la probabilidad de que los pequeños agricultores respondan positivamente a los programas de educación y formación destinados a mejorar, de forma simple y apropiada, el almacenamiento de los agroquímicos en las pequeñas plantaciones de maíz.

3.9 Eliminación de los envases vacíos que han contenido paraquat

La eliminación de los envases vacíos que han contenido paraquat es otra esfera en la cual gran parte de los métodos usados por los pequeños agricultores son improvisados y podrían mejorarse. Se sabe que la eliminación de los envases de todos los agroquímicos plantea problemas en los países en vías de desarrollo. La encuesta demostró que sólo la tercera parte de los pequeños agricultores eliminan los envases de paraquat vacíos de la manera recomendada, es decir, enterrándolos o quemándolos. La mayoría de ellos simplemente los desechan o los reutilizan. Esta última práctica es potencialmente peligrosa y no se recomienda. Sin embargo, un aspecto tranquilizador es el

Cuadro 17. Almacenamiento del paraquat por los pequeños agricultores.

		(Valores expresados en porcentaje de la muestra)		
		Guatemala	El Salvador	Honduras
I	Volumen medio comprado (litros)	3	5	3
II	El volumen comprado suficiente para:			
	un año entero	8	13	7
	1 ciclo completo de maíz	38	68	37
	1 aplicación	54	19	55
	Total	100	100	100
III	¿Se almacenó alguna cantidad de paraquat sobrante después de la última cosecha de maíz?			
	SI	34	30	66
	NO	66	70	34
	Total	100	100	100
Número de respondientes (n)		(120)	(124)	(121)

hecho de que los resultados de la encuesta en los pequeños agricultores indican que los envases de paraquat se reutilizan principalmente para el almacenamiento de líquidos no potables tales como los agroquímicos o los combustibles como el queroseno (Cuadro 20).

Cuando se guardan líquidos consumibles, en envases vacíos que han contenido paraquat la encuesta indica que estos suelen ser lavados por lo menos cuatro veces antes de ser vueltos a usar. Esto demuestra que los pequeños agricultores se dan cuenta de los peligros potenciales que presentan los residuos del producto que quedan en el envase, pero aún así no es una práctica que se recomienda. A pesar de ello, es poco probable que el paraquat residual en las paredes del envase se filtre en el agua de beber en cantidades suficientes como para representar un peligro significativo.

RESUMEN Y DISCUSION DE LOS RESULTADOS

Los resultados demuestran que por lo general, los productores de maíz centroamericanos están enterados de los peligros potenciales asociados con el mal uso del paraquat, y ponen de relieve el grado de su uso en los sistemas de manejo de las malezas en el maíz. Aunque los resultados indican que las normas observadas por los pequeños agricultores suelen ser adecuadas para el uso seguro del paraquat, confirman la importancia de continuar con las actividades de educación y formación destinadas a mejorar las prácticas de los pequeños agricultores.

La mayoría de los pequeños agricultores usan el paraquat desde hace más de cinco años, y se muestran muy bien enterados de las consecuencias potencialmente mortales de la ingestión de pequeñas cantida-

Cuadro 18. Sitio donde los pequeños productores de maíz almacenan el paraquat.

		(Valores expresados en porcentaje de la muestra)		
Respuestas de los pequeños agricultores acerca del sitio de almacenamiento		Guatemala	El Salvador	Honduras
I	En un cobertizo apartado de la casa	46	22	21
II	En la casa—en un sitio elevado	24	39	57
III	En la casa—en el suelo/un rincón	6	17	3
IV	En una caja	3	5	4
V	Fuera de la casa	4	—	—
VI	Enterrado en el suelo	8	3	5
VII	Otros	9	14	10
	Total	100	100	100
Número de respondientes (n)		(120)	(109)	(121)

Cuadro 19. Motivos de la elección del sitio de almacenamiento.

Respuestas agrupadas de los pequeños agricultores	(Valores expresados en porcentaje de la muestra)		
	Guatemala	El Salvador	Honduras
I Peligroso/para evitar el peligro	25	41	41
II Para impedir que los niños lo alcancen/toquen/a distancia de los niños	39	42	53
III Mal olor	5	—	—
IV Para evitar la contaminación/contacto	11	—	20
V Para más seguridad/seguridad de todos	20	18	23
VI No hay otro sitio	3	—	—
VII Otras	18	24	18
Número de respondiente (n)	(120)	(124)	(121)

des del producto. Sin embargo, muchos pequeños agricultores creen que la aplicación del paraquat diluido es más peligrosa que la mezcla del producto concentrado. Es importante que las actividades futuras de educación y formación incluyan esfuerzos por corregir este concepto erróneo muy difundido.

La mezcla y aplicación del paraquat suele hacerla el jefe de la familia o sus hijos adultos. No había ninguna indicación de que las mujeres o niños participasen de manera significativa en tales actividades.

Las medidas higiénicas son un aspecto importante del uso seguro del paraquat: la contaminación de la piel, en particular, sobre todo por el producto concentrado, debe minimizarse. A este respecto, los resultados son tranquilizadores ya que la mayoría de los pequeños productores de maíz señalaron que no habían derramado el producto sobre su persona y estaban enterados de la necesidad de lavarse para quitar

toda cantidad de paraquat concentrado que les cayera en la piel. Sin embargo, se destaca una vez más la importancia de seguir enseñando a los pequeños agricultores las prácticas que se estiman buenas, debido al hecho de que son pocos los pequeños agricultores que usan guantes de hule o protección ocular. La mayoría no lo hacen porque no han tenido problemas o lo consideran un gasto superfluo.

Las normas de aplicación del paraquat diluido eran perfectamente adecuadas. De manera típica, los pequeños agricultores usaban una camisa de mangas largas, un pantalón largo y calzado (generalmente botas o zapatos de hule). La mayoría de ellos parecían darse cuenta de la necesidad general de lavar la ropa una vez terminada la aplicación, lo que apoya una vez más la impresión general que dan los resultados de la encuesta, de que los pequeños agricultores, lejos de descuidar la seguridad, en realidad manipulan el paraquat e, implícitamente, los demás agroquímicos, con bas-

Cuadro 20. Eliminación y reutilización de los envases vacíos.

	(Valores expresados en porcentaje de la muestra)		
	Guatemala	El Salvador	Honduras
I Método de eliminación			
Quema	20	10	18
Entierro	17	4	18
Desecho	34	35	31
Retención	29	51	33
Total	100	100	100
II Uso si se retienen			
Reventa	—	1	—
Guardar agroquímicos	13	7	5
Guardar combustible	10	3	8
Guardar alimentos o agua	5	20	6
Otros usos además de almacenamiento de alimentos o agua	1	20	14
Número de respondientes (n)	(120)	(124)	(121)

tante precaución. El hecho de que la mayoría de los pequeños productores de maíz se lavan tan pronto como haya terminado la aplicación sirve de prueba adicional en este sentido.

Otro requisito previo importante del uso seguro del paraquat es la concentración a que se aplica. Los resultados indican que la mayor parte de las diluciones hechas por los pequeños agricultores son muy inferiores a la concentración máxima de 1 parte del producto por cada 40 partes de agua, que es lo recomendado para la aplicación manual. Sin embargo, según ciertas indicaciones es posible que los métodos inexactos de medir el producto concentrado estén produciendo concentraciones de paraquat próximas a los niveles máximos recomendados, y que tales concentraciones se usen por una proporción reducida de los usuarios de paraquat entre los pequeños agricultores. Una vez más, se resalta la necesidad de proseguir los esfuerzos de educación y formación.

La mayoría de los pequeños agricultores no habían sentido ningún efecto nocivo asociado con el uso del paraquat. Como se esperaba, la mayor parte de los efectos nocivos notados tenían niveles de incidencia relativamente bajos y se concentraban en la piel de las manos, los brazos y la espalda. Esto refleja la suficiencia general de las medidas de higiene practicadas por los pequeños agricultores durante el uso del paraquat, así como su exposición relativamente leve al producto, generalmente algunos días al año. Sin embargo, el hecho mismo de que se produzcan lesiones poco importantes confirma la necesidad de proseguir los es-

fuerzos por reducir todavía más su incidencia mediante programas apropiados de educación y formación de los pequeños agricultores.

Aunque los resultados indican que los pequeños agricultores sólo compran pequeñas cantidades de paraquat y de manera típica, no guardan existencias del producto de una temporada a la próxima, gran parte de sus métodos de almacenamiento son improvisados y presentan posibilidades considerables de mejora. No obstante, está claro que la mayoría de los pequeños agricultores se dan cuenta de la necesidad de guardar los agroquímicos de manera segura y tratan de elegir sitios de almacenamiento adecuados.

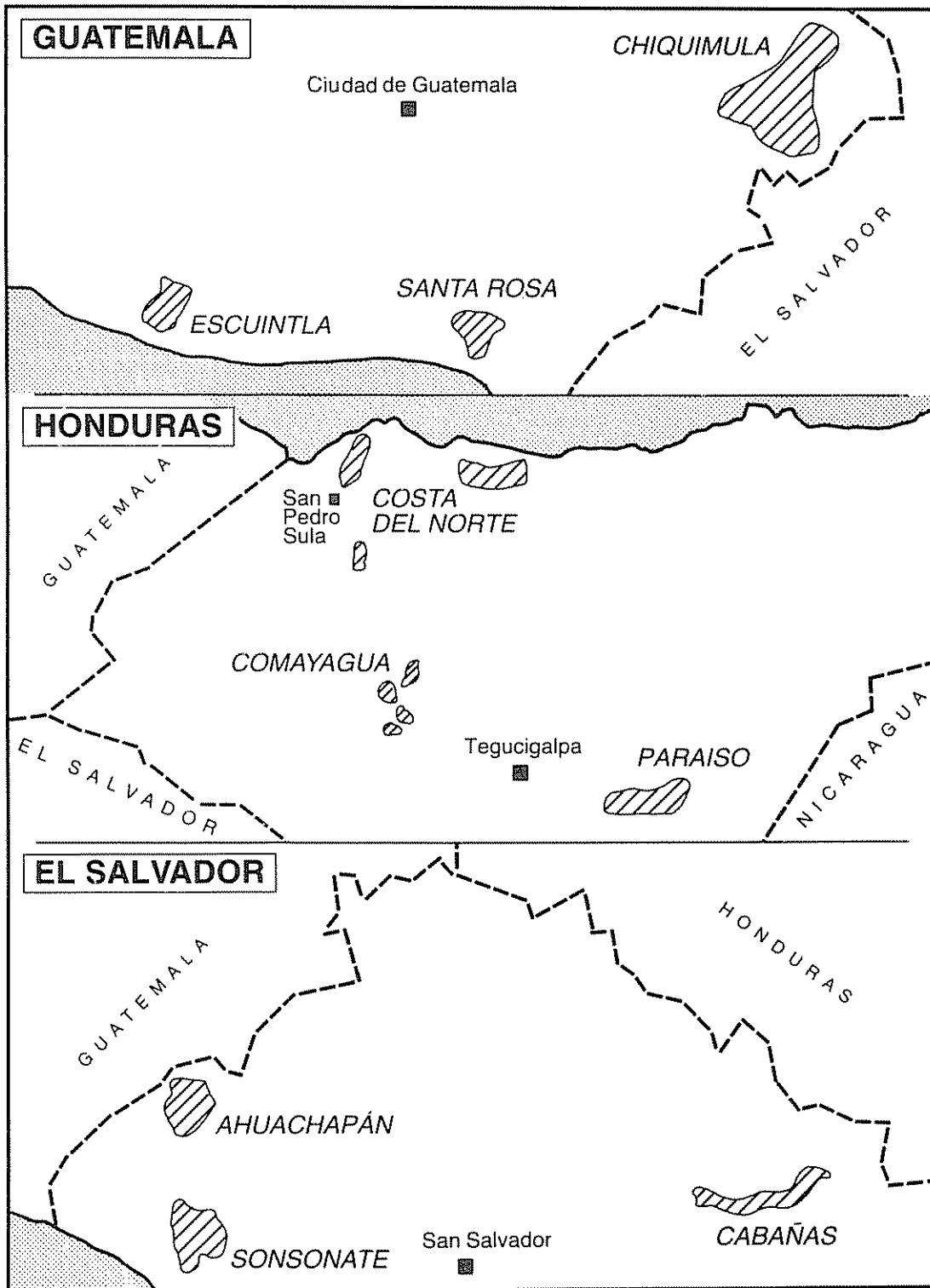
Otra esfera en la cual las prácticas de los pequeños agricultores son en gran parte improvisadas e insuficientes es la eliminación de los envases vacíos que han contenido paraquat. Aunque algunos pequeños agricultores adoptan el método recomendado de quemar o enterrar los envases vacíos, la mayoría de ellos no lo hacen. Simplemente los desechan o los reutilizan —principalmente para guardar líquidos no potables tales como agroquímicos o combustibles tales como el queroseno. En el caso de líquidos potables, los agricultores, como se ha determinado en este estudio, están enterados de los peligros potenciales asociados con la reutilización de los envases de agroquímicos, y toman la precaución de lavar los envases vacíos varias veces antes de volver a usarlos. Sin embargo, se vuelve a hacer hincapié en la necesidad de continuar la educación y formación para poner fin a esta mala práctica, ya que la misma conlleva un riesgo toxicológico.

LITERATURA CITADA

1. ABBOTT, I.M.; BONSALL, J.L.; CHESTER, G.; HART, T.B.; TURNBULL, G.J. 1987. Worker exposure to a herbicide applied with ground sprayers in the UK. *Am Ind Hyg Assoc J.* 48(2):167-175.
2. HART, T.B. 1987. Paraquat — a review of safety in agricultural and horticultural use. *Human Toxicology* 1987:6, 13-18.
3. HOWARD, J.K.; SABAPATHY, N.N.; WHITEHEAD, P.A. 1981. A study of the health of Malaysian plantation workers occupationally exposed to paraquat. *Br. J. Ind. Med.* 38:110-116.
4. SWAN, A.A.B. 1969. Exposure of spray operators to paraquat. *Brit J Ind Med.* 26:322-329.

APENDICE 1

Ubicación de *LOS SITIOS INCLUIDOS* en la Encuesta de Pequeños Agricultores



Reseña de Libros

FISHER, E.P. y LIPSON, CAROL. 1989. *Thinking about science*. London, W.W. Norton, 334 p.

Cualquiera que tenga interés en la ciencia y cualquiera que esté obligado a tener interés en ella, debería leer esta excelente biografía de Max Delbrück. El libro presenta con claridad la relación entre las ciencias, en este caso, entre la física y la biología, y aquella entre un singular científico y su ciencia.

Al comienzo de los novecientos setenta, Sir David Phillips, en cuyo laboratorio en Oxford yo estaba trabajando, me pidió que visitase a Herbert Frölich en Liverpool. Frölich era un físico teórico que había trabajado en superconductividad y que también estaba proponiendo un enfoque revolucionario hacia las interacciones entre macromoléculas biológicas. Era este un intento para explicar la actividad altamente ordenada de la célula, incluyendo, entre otras cosas, la forma como trabajaban las enzimas.

Fui a ver a Frölich porque yo había sido entrenado como físico teórico y esperábamos encontrar si había algo en su teoría que, yo diría, volaba en la cara de todo lo que los biólogos moleculares creían sobre las interacciones entre las moléculas biológicas grandes. Frölich creía en fuerzas de "resonancia" de largo alcance entre moléculas idénticas. Los otros biólogos moleculares preferían fuerzas de corto alcance entre sitios que son complementarios topográficamente sobre superficies moleculares opuestas. Esto está tipificado por las dos cadenas complementarias de DNA dentro de la doble hélice.

Al buscar alguna perspectiva en la teoría de Frölich, descubrí que el físico teórico, Pascual Jordan, había formulado esencialmente la misma idea unos años antes. Había sugerido lo que podría ser la base para una multiplicación molecular. Esta idea fue rechazada enfáticamente por Linus Pauling en un corto artículo en la revista *Science*. El artículo de Pauling parecía presagiar la idea de complementariedad como la ruta hacia la replicación y suministrar la base físico-química para la genética, más tarde brillantemente realizada por la doble hélice de Crick y Watson.

El coautor del artículo de Pauling en *Science* fue Max Delbrück. Nunca había oído antes su nombre. Esto pasó cuando conocí a Laura Fermi, la viuda de Enrico Fermi, quien había construido la primera pila

atómica. Laura Fermi acababa de escribir su libro, *Illustrious Immigrants*, que trataba de la inmigración intelectual de Europa en los novecientos treinta. Ella estaba particularmente interesada en los físicos que se habían adentrado en la biología; Delbrück figuró prominentemente en su conversación.

En 1935, Delbrück había hecho una impresionante contribución a la genética. Publicó un artículo con Timofeef-Ressousky y K. G. Zimmer, sobre la estructura del gen. Basando sus cálculos en la producción de mutaciones mediante la radiación ionizante, los autores hicieron un estimado de la longitud de un gen típico. Esta era de unos pocos miles de nanómetros... correcto dentro de un orden de magnitud. Propusieron también que las mutaciones eran cambios en estados de energía dentro de la macromolécula genética.

Está claro ahora que la teoría estaba equivocada y que no podría conducir a una manera de determinar las estructuras detalladas de los genes. Sin embargo, en un tiempo en que la creencia de que los genes eran objetos concretos, estaba lejos de ser universal y que pocos creían que fueran siquiera moléculas (y no simplemente una manera útil de mirar las cosas), la investigación parece notablemente progresista.

Es interesante que los informes científicos "oficiales" del desarrollo de la biología molecular, tales como "*The Double Helix*" de James Watson, no incluyen las investigaciones anteriores de Delbrück sobre el gen como uno de los eventos significativos. Pero, los científicos son raramente historiadores. Si ellos poseyeran una manera más histórica de mirar las cosas, reconocerían que la biología molecular no comenzó en los novecientos cuarenta. Antes bien, había funcionado desde el siglo XIX y la investigación de Delbrück encajaba en un desarrollo histórico de larga continuidad. El problema, como lo saben los buenos historiadores, es que la comprensión de uno sobre algo pasado depende de lo bien que uno puede ignorar el presente. Para un científico la importancia de la ciencia del pasado descansa solamente en la contribución directa que hace a la comprensión del entendimiento científico del presente.

Indirectamente, el trabajo de Delbrück influyó grandemente en desarrollos posteriores. Figuró prominentemente, por ejemplo, en el libro de Erwin Schrödinger, *What is Life?* Este fue un intento, de un físico teórico, de examinar la genética, e inspirar a

Francis Crick, Jim Watson y varios otros, a interesarse en los genes, con resultados notables para la genética.

Más tarde, Delbrück fundó con Salvador Luria la influyente "escuela bacteriofaga" de la biología molecular y, con el tiempo, cosechó su justa retribución como científico innovador y exitoso, al ser merecedor del Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1969. Claramente, vivió una plena y exitosa vida como uno de los principales científicos del mundo. Fue obviamente estimado y respetado por sus colegas y ocasionalmente también criticado, como por ejemplo, por Bárbara McClintock (Premio Nobel 1983, ver *Turrialba* v. 33, p. 416, nota del traductor). Fue también un notable crítico de lo que él percibía como mala ciencia. Sin embargo, lo que es más importante para Delbrück y esto se nota muy claramente en *Thinking about Science*, es que su motivación parece haber sido muy poco común. Mientras que los biólogos moleculares son, casi siempre, lo que puede ser descrito como reduccionistas ontológicos, Delbrück era más bien un reduccionista epistemológico: se interesaba en los límites del conocimiento sobre objetos biológicos antes que en la verdadera naturaleza de los objetos. Esto parece sorprendente en un biólogo molecular pero debe recordarse que él comenzó su carrera científica como un físico y en una época en que se estaba desarrollando la mecánica cuántica. Delbrück fue influido por el físico teórico danés, Niels Bohr, particularmente por sus intentos de formar el concepto de la complementariedad. Esto no tiene nada que hacer con esas inherentes interacciones moleculares, sino con las que existen entre las propiedades (aparentemente) incompatibles de ondas y partículas en los electrones.

Delbrück estaba bastante sorprendido por esta paradoja que parecía haber en el corazón del concepto del mundo (como también lo estaba Pascual Jordán, otro discípulo de Bohr). Creía que el estudio de la biología debía mostrar algo similar; esto revelaría nuevas leyes de la naturaleza. La convicción, profundamente sostenida de que algo fundamental e inesperado podría emerger durante el desarrollo de la biología molecular, se manifestó en formas diferentes y contradictorias. Por ejemplo, en un desengaño obvio en la doble hélice de DNA de Crick y Watson, Delbrück describió la explicación que ella ofrecía sobre la replicación como una "treta ridículamente simple". Esta es una reacción de parte del hombre que no sólo había introducido la física en la genética sino que también había escrito el artículo con Pauling sobre la otra cla-

se de complementariedad, que según Pauling, profetizaba el carácter clave de la replicación del gen. El uso peyorativo de Delbrück de "simple" es particularmente sorprendente, porque la simplicidad parece haber sido siempre lo que él mismo buscaba. Parece haber sentido, por ejemplo, que la reproducción debería ser estudiada como una cualidad lógicamente inevitable del Universo y haber estado desengañado que eso resultó, aún en los relativamente simples bacteriófagos con los que trabajaba, algo complicado y confuso. Delbrück fue muy crítico y solitario en su crítica de la hipótesis de Tatum y Beadle, de "un gen — una enzima", la que acusó de ser demasiado simple.

Delbrück fue indiscutiblemente uno de los pioneros de la moderna biología molecular. Ernst Peter Fischer y Carol Lipson están de acuerdo en que es el más interesante, principalmente debido a una perspectiva filosófica que lo hace algo inseguro sobre el tipo de explicación que ofrece la biología molecular a los fenómenos biológicos. Lo notable es que él aplicó el enfoque intelectual de un físico teórico directamente a la biología. A veces, esto funcionaba; otras veces no. Cuando yo me moví de la física teórica a la biología, descubrí un enorme golfo que había que cruzar. La biología molecular tenía afinidades mucho más claras con la química que con la física. Es la química la que intenta ver al mundo a través de la forma de las moléculas, no la física.

Uno no puede evitar el pensar que lo que Delbrück estaba esperando era descubrir alguna forma de contradicción mutua en la biología. Esto eliminaría la tensión entre su inclinación emocional hacia el principio de complementariedad y los tipos de explicación que la biología molecular resultaba suministrando, los que él tenía que aceptar cada vez más pero sin voluntad. Conforme yo leía *Thinking about Science*, no podía evitar el pensar en Philip Gosse y la tensión generada en él por sus creencias cristianas fundamentalistas y la teoría de la evolución de Darwin. Más aún, como Walt Whitman dijo en su *Song of Myself*: "¿Acaso me contradigo? Muy bien, entonces me contradigo a mí mismo. Yo soy grande y contengo multitudes"

Max Delbrück ciertamente contenía multitudes. Estas palabras podrían ser un epitafio justo para él.

JOHN GALLOWAY
CANCER RESEARCH CAMPAIGN
LONDON, ENGLAND

WATERMAN, T. 1989. *Animal navigation*. London, W.H. Freeman, 243 p. (Price: £ 14.95).

Dudo que cualquier fenómeno natural haya excitado, al mismo tiempo, la curiosidad del hombre corriente y del científico como el misterio de la navegación animal. Las extraordinarias hazañas de las largas migraciones que llevan a cabo muchos animales todos los años, a través de océanos y masas terrestres, muchas veces sin características diferenciadas, han parecido algo milagroso a nosotros, que somos seres más sedentarios

Algunas hazañas, tales como el uso de una brújula solar de la abeja y su ahora famosa danza pendular con la cual transmite información sobre la ubicación de la fuente de néctar, han sido elucidadas por laboriosas investigaciones. Otras continúan intrigando a los biólogos, tales como la vuelta de 40 mil kilómetros de la golondrina marina (*Sterna* sp.) entre su habitat invernal en la costa antártica y sus lugares de cría en el ártico, o en el viaje, una vez en su vida de la anguila común, desde sus lugares de cría en la mitad del Atlántico, en el Mar Sargaso, a los ríos de la costa europea en los cuales madura

Es la enorme escala de estas migraciones intercontinentales que hace tan difícil a los humanos estudiarlas. A pesar de todo esto, en las últimas décadas se han hecho algunos progresos espectaculares. El advenimiento del radar durante la segunda guerra mundial permitió a los científicos seguir el vuelo de ciertas aves individuales por largas distancias y así aprender mucho sobre cómo navegan las aves cuando migran

En *Animal Navigation*, Talbot Waterman nos presenta una guía sucinta del estado actual del arte con la fórmula muy usada por *Scientific American*, de incluir en los textos profusas ilustraciones que hacen más placentera su lectura. Comienza con una breve pero panorámica vista de la migración en varios grupos de animales con un capítulo algo inconclusivo sobre el porqué la migración se desarrolló. Entre éstas, el grueso del libro constituye una detallada discusión de los mecanismos de la migración

Mucho de esto sirve para demistificar las hazañas de navegación que han intrigado por tanto tiempo a los observadores humanos. Entre las ahora familiares historias están esas del salmón que navega su regreso a las nacientes de la corriente en la cual se crió, siguiendo la gradiente del sabor en el río al desembocar al mar; el uso que hace la abeja de la luz polarizada

para localizar el Sol al dirigirse de la colmena al lugar en que se encuentran las flores; y el uso por los pinzones (*buntings*) migradores de una brújula magnética enfocada en la estrella polar. Por último, tenemos la brújula magnética que tantos animales —y humanos también— se sabe ahora que ciertamente poseen. Todo esto lo narra Waterman en detalle, explicando lucidamente la ciencia física que lo sustenta

Para mí, sin embargo, la parte cumbre de *Animal Navigation* es el capítulo sobre navegación humana. Entre los años 1000 A.C. y 600 D.C., los viajes de exploración y colonización en el Pacífico Oriental y Australia que hicieron los polinesios, representaron viajes de tres mil y más kilómetros, sin la ayuda de la tecnología moderna de la navegación. Aunque sus habilidades se han perdido casi totalmente, algo de esta sabiduría de un pueblo ha sido conservada como para estudiarlas detalladamente. En 1976, un piloto nativo de la Micronesia, utilizando solamente su conocimiento tradicional empírico de las formas características de las olas creadas por la mezcla de corrientes marinas y de características naturales de la superficie del mar, navegó una réplica de una canoa oceánica de vela en un curso virtualmente recto de 3 300 kilómetros entre Hawaii y Tahiti, a pesar de estar fuera de vista de tierra alguna durante la mayor parte del viaje de treinta días.

En realidad, los navegantes del Pacífico tenían varias fuentes adicionales de conocimientos acerca de su posición durante su ruta. En latitudes tropicales, los grupos de islas están tan distantes unos de otros que ellos pueden ser localizados navegando a un punto donde una estrella específica está directamente encima de su zenit. Fiji, por ejemplo, está situada directamente debajo de la estrella Sirio (constelación del Can Mayor), Hawaii debajo de Arturo (constelación del Boyero) y las islas Solomón debajo de Rigel (constelación de Orión). Aquí es que admiramos una de las ilustraciones tipo *Scientific American*, en la que se ve un mapa de las islas del Sur, una semiesfera en la que se elevan hacia el firmamento rayas hacia cinco estrellas, tres mencionadas anteriormente, más Altair (constelación el Aguila) encima de Puluwat, y Saiph, encima de Santa Cruz.

Al igual que la historia desarrollada de la navegación animal, la conclusión es que todo es fácil cuando uno sabe cómo funciona. Pero, aunque ya no existe el misterio, nuestra fascinación y admiración por las facultades de ambos navegantes —humanos y no humanos— es más grande. Sus propias vidas dependen de esa pericia.

Quizás, la única falla del libro es la extensión con que Waterman se deja llevar por muchos aspectos de menor importancia del sentido del espacio de los animales, algunos de los cuales (por ejemplo, las estrategias para conseguir las hormigas su alimento) parecen tener solamente una tenue relación con la navegación.

Dedica un capítulo entero, por ejemplo, a los relojes biológicos y a los mecanismos biológicos que los caracterizan. Un sentido del tiempo es seguramente esencial para las abejas y aves que usan el Sol como brújula, porque la ruta del Sol a través del día los obligaría a volar en un círculo si volaran simplemente a un ángulo constante. Pero, la relevancia para la navegación del sentido del tiempo del cangrejo verde

en sus recorridos en relación con las mareas, no está clara.

Este, entonces, es un libro para el entusiasta antes que para el experto. Este último es probable que se sienta frustrado ante la indiferencia para documentar la evidencia para todas sus aserciones. Pero, el lector corriente sin duda encontrará esto fascinante; la relación de uno de los fenómenos extraordinarios que el mundo nos ofrece.

ROBIN DUMBAR
PROFESOR OF BIOLOGICAL ANTHROPOLOGY
UNIVERSITY COLLEGE
LONDON, ENGLAND