

MÉTODOS DE EVALUACION Y NIVELES DE RESISTENCIA EN MAÍZ A LA PUDRICION DE LA MAZORCA CAUSADA POR *Fusarium moniliforme* ¹ *

Francisco Salazar F.** y Edgar Vargas G.***

ABSTRACT

Methods of evaluation and levels of resistance in corn to ear rot caused by *Fusarium moniliforme*. *F. moniliforme* was prevalent in corn ears regardless of geographical origin. Numerous isolations of this fungus were made in several natural media tested for cultivation and sporulation. The medium made of corn kernels was the best to prepare the inoculum. In the field, inoculations and appraisal of infection were made on 11 different kinds of maize, including cultivars, lines and hybrids. Two methods of artificial inoculation in the ear were tested: a) a spore suspension was sprayed on the stigmas and b) an infected toothpick was introduced in the ear; two isolates of *F. moniliforme* were tested by each method. The toothpick method was the most adequate for inoculating ears. The local variety Rocamex Tusa Morada showed high resistance to both isolates, which differed on morphological and physiological characteristics.

INTRODUCCION

Uno de los principales factores que limitan la obtención de altos rendimientos en el cultivo del maíz es el de las enfermedades. Las pudriciones de la raíz, tallo y mazorcas, causadas por *Gibberella zeae* y *Fusarium moniliforme* Sheld, ocasionan en el maíz mayores pérdidas que todas las otras enfermedades juntas (7), en especial cuando existen condiciones ambientales favorables durante el desarrollo y maduración de las mazorcas (12). Varios autores, han determinado que *F. moniliforme* es el que prevalece como patógeno en las mazorcas (7,12,14). La pudrición de la mazorca por *F. moniliforme* es una de las más importantes y de más amplia distribución en Costa Rica. La mayor incidencia se pre-

senta en las zonas húmedas del Pacífico Sur y Zona Atlántica, aunque también en el Valle Central las pérdidas son altas (1).

La mayoría de los materiales comerciales utilizados en Costa Rica son susceptibles a esta enfermedad; consecuentemente, la selección de materiales resistentes constituye un paso fundamental hacia la obtención de métodos apropiados de control. Estudios preliminares han señalado la existencia de materiales tolerantes en diversas localidades de Costa Rica, especialmente en maíces criollos de zonas muy húmedas (1,13).

Una de las características de este género de hongos es la gran variabilidad que presenta, tanto en sus características morfológicas como en su patogenicidad, lo que da como resultado la aparición de razas (3) y la necesidad de evaluar la resistencia ante diversos aislamientos de cada región.

No hay consenso entre los investigadores sobre la mejor manera de evaluar la resistencia. Hooker (8), afirma que no hay asociación entre la resistencia en la mazorca y el tallo, aunque algunos maíces pueden tener resistencia en ambos a un mismo tiempo. Sin embargo, Zenteno y Muñoz (18) encontraron una relación altamente sig-

¹ Recibido para su publicación el 28 de febrero de 1977.

* Parte de la tesis del primer autor para obtener el grado de Ingeniero Agrónomo en la Facultad de Agronomía de la Universidad de Costa Rica.

** Actualmente nutricionista, Purina de Occidente, Apartado 1085, Maracaibo, Venezuela.

*** Fitopatólogo, Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica.

nificativa entre los datos de evaluación de infección natural en las mazorcas en el campo y los datos de evaluación de marchitez de las plántulas en el laboratorio, ambas causadas por *F. moniliforme*. Koelher (12) afirma que hay poca relación entre la resistencia en las líneas como tales y la resistencia en sus combinaciones o híbridos. Sin embargo, Smith y Madsen (14), encontraron relación entre la resistencia de los híbridos a la pudrición de la mazorca y su ascendencia. Ullstrup (16) encontró, al inocular mazorcas con *F. roseum*, que los híbridos de un padre resistente y uno susceptible, eran resistentes y sugirió que la resistencia puede ser de tipo dominante.

Varios investigadores han evaluado diversos métodos de inoculación artificial bajo diferentes condiciones, sin que haya un criterio uniforme acerca de cuál es el mejor (2,9,12,14,16,17,18). Aparentemente existen varios métodos satisfactorios, adecuados a condiciones locales. Entre estos métodos se han usado los siguientes: el de mondadientes (17); la aspersión de los estigmas de una suspensión de esporas (14); el método del gotero (12); el de inyección de esporas (12); el disparo de proyectiles cargados de esporas sobre la mazorca (2); y el del sacabocados y disco de agar (9).

Kerr (9), comparó la eficiencia de tres sistemas de evaluación en mazorcas inoculadas con *F. moniliforme* siguiendo la técnica de aspersión de Koehler (12). Las tres formas de evaluación fueron: 1) determinación del porcentaje de mazorcas infectadas; 2) uso de una escala de 1 a 4, de acuerdo con el porcentaje de mazorcas podridas; 3) determinación del porcentaje de granos podridos en una muestra representativa. Encontró alta correlación entre los tres métodos.

El presente trabajo tuvo por objeto corroborar la importancia de *F. moniliforme* como causante de la pudrición de mazorca en Costa Rica, probar métodos de evaluación de resistencia, y determinar el nivel de resistencia, así como la forma en que ésta se hereda, en varios materiales locales. La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitopatología y en la Estación Experimental Fabio Baudrit, ambos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Costa Rica.

MATERIALES Y METODOS

Con el fin de tener una idea acerca de la prevalencia de especies de *Fusarium* en los materiales locales, se hicieron aislamientos a partir de granos de maíz que presentaban síntomas de infección, colectados en varias zonas del país: dos en Atenas, tres en Alajuela (Estación Experimental), uno en Santa Ana, uno en Guácimo y tres, de procedencia desconocida, en el Mercado Central. Se hizo uso de los métodos corrientes para aislar en medio nutritivo papa-dextrosa-agar (PDA). La identificación de las especies se hizo siguiendo el sistema de clasificación de Snyder y Hansen (15). Con el fin de seleccionar, dentro de todos los aislamientos obtenidos, los dos más patogénicos, se hizo una prueba preliminar inoculando a mazorcas jóvenes y a tallos de maíz de la línea T-3; en base a esto se seleccionó un aislamiento de Atenas y otro de Alajuela, ambos de *F. moniliforme*.

Para obtener suficiente inóculo para las pruebas en el campo, los aislamientos seleccionados se hicieron crecer en platos Petri grandes, cuyos fondos se cubrieron con granos tiernos de maíz cortados y esterilizados a una temperatura de 120° C y 15 lbs. de presión durante 20 minutos; sobre los granos se pusieron mondadientes de madera, antes de la esterilización. De esta manera, el inóculo fue de dos tipos: suspensión de esporas en agua destilada estéril y mondadientes cubiertos con esporas y micelio del hongo. Las inoculaciones se hicieron 15 a 18 días después de la floración completa de cada variedad, según el método de Koehler (12). Con la suspensión de esporas, se procedió a la inoculación siguiendo la técnica de Ullstrup (16), la cual consiste en los siguientes pasos:

- 1.- Se asperjan 2 ml de la suspensión de esporas (500 a 800 mil esporas/ml) sobre los estigmas.

- 2.- Se coloca sobre la mazorca una toalla de papel absorbente húmeda.

- 3.- Se cubre la mazorca con una bolsa de papel plástico, la cual se retira tres días después.

Para el método de mondadientes el inóculo utilizado consistió del micelio y esporas del hongo que cubren los palillos de madera; se inoculó según la técnica de Young (17), la cual consiste en los siguientes pasos:

1.- Se hace un orificio, con un punzón para picar hielo, en la mitad del tercio superior de la mazorca.

2.- Se introduce un palillo con el inóculo.

3.- Se cubre la mazorca, de acuerdo con la modificación hecha por Boling *et al* (2), con una bolsa de papel impermeable de las usadas en cruzamientos ("glassine"), la cual permanece hasta el momento de la evaluación.

Para cada método de inoculación se usaron dos testigos: uno asperjando 2 ml de agua destilada estéril sobre los estigmas y otro introduciendo palillos estériles, de acuerdo en ambos casos a las técnicas anteriores. Se inocularon de 10 a 15 mazorcas con cada tratamiento.

Las mazorcas inoculadas con *F. moniliforme* se evaluaron a los 40 días después de la inoculación; para ello se utilizó una escala de infección según la proporción de la mazorca visiblemente afectada, que va de 0 (mazorca sana) a 8 (infección total). Para el análisis estadístico, se calculó un Índice de Infección. Además de las mediciones indicadas anteriormente, se midió el grado de infección natural de *F. moniliforme* en las mazorcas testigos.

Para el estudio de la resistencia a la pudrición de la mazorca en maíces locales, se utilizó como diseño experimental un arreglo factorial 11x3x2, en un bloque al azar con 4 repeticiones y parcelas con subdivisión repetida. Cada repetición estaba formada por 11 parcelas grandes de 5x5 m con cada uno de los maíces estudiados. Cada parcela grande estaba constituida por tres hileras de plantas separadas entre sí a 25 cm, representando las sub-parcelas, los cuales llevaban los dos aislamientos del hongo y el testigo. A su vez, cada sub-parcela estaba constituida por dos sub-subparcelas, representadas cada una por la mitad de la hilera para cada uno de los métodos de inoculación.

Los maíces estudiados se obtuvieron de la colección de germoplasma del Programa de Maíz de la Estación Experimental Fabio Baudrit. Se siguió el criterio de seleccionar para el estudio no sólo líneas de características agronómicas conocidas, sino también sus híbridos, con el fin de tener información sobre la transferencia genética de la resistencia o susceptibilidad a la enfermedad bajo estudio. Los

maíces seleccionados fueron 1) Tico H-1 x Tuxpeño 107-1; 2) Tuxpeño 107-1; 3) Tico H-1 x Tuxpeño 52-1; 4) Tuxpeño 52-1; 5) ETO 70-1; 6) Rocamex 163-1; 7) Rocamex 163-1 x ETO 70-1 (Tico H-1); 8) Eto Blanco; 9) Rocamex Tusa Morada; 10) Rocamex V-520-C; 11) Sintético No. 1.

El ensayo se realizó en la Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit, de la Universidad de Costa Rica, ubicada en la Provincia de Alajuela, a una altura de 840 m, sobre el nivel del mar con una temperatura media de 21.1° C y una precipitación anual de 1975 mm (promedio de 10 años).

RESULTADOS

La identificación de los aislamientos, hecha de acuerdo con el sistema de clasificación de Snyder y Hansen (15), demostró la prevalencia de *F. moniliforme* en los granos de maíz, independientemente de la proveniencia geográfica del material infectado. Los aislamientos mostraron gran variabilidad en sus características morfológicas, coloración y velocidad de crecimiento, así como en las pruebas de patogenicidad. En base a estas características se escogieron dos aislamientos para los trabajos posteriores.

El análisis de variación de los resultados de la evaluación de infecciones de *F. moniliforme* en la mazorca indicó diferencias significativas al nivel de 1% entre los diferentes maíces, entre los aislamientos del hongo y entre los métodos de inoculación, lo mismo que en la interacción entre estos factores estudiados. En el Cuadro 1 se observa que sólo en la variedad Sintético No. 1 se encontraron diferencias significativas entre los dos aislamientos del hongo estudiados, siendo mayor la infección causada por el aislamiento No. 1. Se observa también que todos los maíces, excepto el cultivar de libre polinización Rocamex Tusa Morada, mostraron diferencias significativas entre las inoculaciones con los aislamientos del hongo y el testigo. En el Cuadro 2, se nota que existen diferencias significativas entre los dos métodos de inoculación en todos los maíces estudiados, siendo en todos los casos mayor el índice de infección cuando se inoculó por el método del mondadiente.

De acuerdo a la reacción a los diferentes aislamientos, inoculados en la mazorca, el cultivar Roca-

Cuadro 1. Índices de infección en las mazorcas de maíz inoculadas con cada uno de los aislamientos de *F. moniliforme* y en el testigo con infección natural.

Genotipo	Índices de infección*		
	Aislamiento 1 (Atenas)	Aislamiento 2 (Alajuela)	Testigo
1. Tico H-1 x Tuxpeño 107-1	16.79	17.44	10.73
2. Tuxpeño 107-1	44.67	41.91	17.10
3. Tico H-1 x Tuxpeño 52-1	16.89	20.57	15.01
4. Tuxpeño 52-1	29.98	39.93	17.77
5. Eto 70-1	31.31	30.55	8.48
6. Rocamex 163-1	28.11	28.32	14.05
7. Rocamex 163-1 x Eto 70-1 (Tico H-1)	23.11	30.44	11.84
8. Eto Blanco	23.13	22.28	10.83
9. Rocamex Tusa Morada	1.63	1.59	1.70
10. Rocamex V-520-C	30.75	29.70	10.75
11. Sintético No. 1.	50.32	34.12	12.28
Promedio	28.47	26.99	11.87

* Promedio de las cuatro repeticiones y de los dos métodos de inoculación en cada parcela grande.

m.d.s entre aislamientos del hongo = 7.00

m.d.s entre los maíces estudiados = 7.34

mex Tusa Morada resultó el menos susceptible, con índices de infección muy bajos. Los híbridos triples del Tico H-1 con las líneas de Tuxpeños resultaron a su vez las más susceptibles, junto con el Sintético No. 1. En el Cuadro 2 se observa que las reacciones de los diferentes maíces a la infección por el método de aspersión y a la infección natural (testigo), son muy similares; no se obtuvo diferencia significativa entre ellos. Se obtuvieron coeficientes de correlación altos entre el índice de infección natural y el índice de infección obtenido por el método de aspersión. De acuerdo con los resultados presentados en este mismo cuadro, el método del mondadiente permite obtener una separación más precisa en cuanto a la susceptibilidad de los maíces estudiados, al agruparlos en cuatro grupos bien definidos en orden de menor a mayor susceptibilidad:

Grupo 1) Rocamex Tusa Morada.

Grupo 2) Tico H-1 x Tuxpeño 107-1, Tico H-1 x Tuxpeño 52-1 y Eto Blanco.

Grupo 3) Tico H-1 Rocamex 163-1, Rocamex V-520-C y Eto 70-1.

Grupo 4) Tuxpeño 52-1, Tuxpeño 107-1 y Sintético No. 1.

DISCUSION

Los datos obtenidos, acerca de la prevalencia de *F. moniliforme* en las mazorcas, concuerdan con los reportados ampliamente en la literatura (7,12).

El medio a base de granos tiernos de maíz, utilizado para la producción de inóculo, resultó fácil de preparar y permitió obtener abundante cantidad de inóculo en un tiempo relativamente corto. Entre los factores ambientales que pudieron afectar la incidencia de la pudrición de la mazorca en el período durante el cual se realizó el ensayo, se considera que la alta humedad relativa favoreció la infección natural por *F. moniliforme*. Esto, unido a la falta de

infección por el método de aspersión, fue la causa de la ausencia de diferencias significativas entre los índices de infección natural y los índices de infección en las mazorcas inoculadas por el método de aspersión. La existencia de diferencias altamente significativas entre los aislamientos de *F. moniliforme* se debe en su mayor parte a la menor infección en el tratamiento testigo, el cual se consideró en el análisis estadístico junto con los dos aislamientos del hongo. Esto origina que la interacción entre las variedades y los dos aislamientos del hongo sea significativa al 1%. Sin embargo, si se comparan sólo las infecciones de las mazorcas causadas por los aislamientos del hongo (Cuadro 1), se observa que en casi todos los maíces estudiados no hay diferencias entre las infecciones causadas por los dos aislamientos, con excepción de la variedad Sintético No. 1, en la cual sí se presentan estas diferencias.

Todo esto sugiere que la mayoría de los aislamientos difieren poco en su virulencia y que los maíces presentan unos resistencia y otros susceptibilidad, a ambos aislamientos.

Posiblemente la mayor resistencia a la pudrición de la mazorca del cultivar Rocamex Tusa Morada, haya sido adquirida por la selección a través de años, ya que es una variedad local que se siembra en las zonas más húmedas del país. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Salas (13), que reporta esta variedad con uno de los índices más bajos de infección natural por *Fusarium* spp.

En cuanto a los métodos de inoculación, se considera que el método de inoculación por aspersión de esporas de *F. moniliforme* no funcionó, a pesar de que ha dado buenos resultados con otros hongos

Cuadro 2. Índices de infección de *F. moniliforme* obtenidos por dos métodos de inoculación en las mazorcas de los maíces estudiados.

Genotipo	Índices de infección*			
	método de inoculación			Promedio
	aspersión	monda- dientes	(Testigo inf. natural)	
1. Tico H-1 x Tuxpeño 107-1	9.61	20.37	10.73	14.99
2. Tuxpeño 107-1	18.71	50.41	17.10	34.56
3. Tico H-1 x Tuxpeño 52-1	13.23	21.75	15.01	17.49
4. Tuxpeño 52-1	16.54	48.28	17.77	32.41
5. Eto 70-1	6.59	39.42	8.48	23.00
6. Rocamex 163-1	12.80	36.31	14.05	24.56
7. Rocamex 163-1 x Eto 70-1 (Tico H-1)	10.68	36.25	11.84	23.46
8. Eto Blanco	9.93	27.57	10.83	18.75
9. Rocamex Tusa Morada	0.60	2.68	1.70	1.64
10. Rocamex V-520-C	10.75	36.73	10.75	23.73
11. Sintético No. 1.	13.77	50.71	12.28	32.24

* Promedios de las cuatro repeticiones y de tres sub-subparcelas en cada método de inoculación.

m.d.s. entre los maíces estudiados = 7.34

m.d.s. entre los métodos de inoculación en cada maíz = 6.37

en maíz (14,16); esto sugiere que el hongo no fue lo suficientemente agresivo para causar infección a través de los estigmas, o que fue afectado por la alta temperatura dentro de la bolsa plástica que cubría la mazorca. El método del mondadiente en cambio, es una técnica simple de inoculación, que permite inocular gran cantidad de material en un tiempo relativamente corto y causar además, una infección alta y uniforme, que permite distinguir con mayor precisión las reacciones de susceptibilidad entre los maíces estudiados.

La existencia de un alto coeficiente de correlación entre los índices de infección natural y los índices de infección obtenidos por el método de aspersión, y la ausencia de diferencias significativas entre ambos, parecen indicar que todas las infecciones evaluadas en las mazorcas sometidas a este método de inoculación, se deben al inóculo natural existente en esa localidad.

El agrupamiento de los materiales de acuerdo con las infecciones en las mazorcas causadas por el método del mondadiente, sugiere la posibilidad de que la resistencia a la enfermedad esté controlada por genes de efecto aditivo, ya que los híbridos triples del Tico H-1 por las líneas de Tuxpeño presentan menor susceptibilidad que sus progenitores susceptibles. Sin embargo, es difícil saber, en base a estos resultados, si esa menor susceptibilidad tiene un origen genético o se origina en el mayor vigor de los híbridos. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Smith y Madsen (14), quienes encontraron relación entre la resistencia en los híbridos de acuerdo a su ascendencia.

De acuerdo a los resultados obtenidos en cuanto a infección natural en las mazorcas, pareciera que este fue un buen método de evaluación de resistencia a esta enfermedad. Sin embargo, está supe- ditado a la variación que ocurre en las condiciones ambientales y a la cantidad de inóculo en cada localidad. Es esencial evaluar el material mediante métodos de inoculación que garanticen infecciones seguras y uniformes. No obstante, Kerr (9) afirma que todo método de inoculación artificial, que desprece las barreras naturales que opone la planta al patógeno, es inconveniente. Sin embargo, se puede considerar que el método de inoculación del mondadiente es funcional, aunque desprece la protección de las brácteas y otras características morfológicas de la mazorca y el tallo, ya que permite obtener reacciones diferentes en las interacciones entre hospedante y aislamientos; porque en realidad lo más importante es la resistencia inherente de la mazorca

y el tallo. Además, este método se asemeja en cierta forma a la infección natural, debido a los daños frecuentes de insectos que propician la penetración directa de los hongos.

Existen diferencias morfológicas y fisiológicas entre los aislamientos utilizados en este trabajo, por lo que cabría considerarlos como razas fisiológicas. Esto viene a complicar más la obtención de híbridos resistentes; sin embargo, de acuerdo con esta prueba, existen materiales con resistencia horizontal que pueden servir como fuentes de germoplasma, para incorporación de resistencia en nuevas variedades.

RESUMEN

Numerosos aislamientos, hechos a partir de granos de mazorcas con pudrición, demostraron la prevalencia de *F. moniliforme* por sobre otros hongos, independientemente de la proveniencia geográfica del material infectado. El medio a base de granos tiernos de maíz fue el más adecuado para la preparación de inóculo. El mejor método para la inoculación de mazorcas en el campo fue el del mondadiente, infestado de micelio y esporas del hongo, insertado en la mazorca. El cultivar local Rocamex Tusa Morada, originario de la zona de San Carlos, mostró una gran resistencia a dos aislamientos del patógeno. Los híbridos triples del Tico H-1 con las líneas de Tuxpeño 107-1 y Tuxpeño 52-1 fueron también resistentes a la pudrición de la mazorca. Los aislamientos inoculados difirieron en virulencia.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen a los Drs. Ronald Ehandi, Rodrigo Gámez y Luis Carlos González, y al Ing. Carlos A. Salas, las sugerencias en el manuscrito, y al Dr. Gilberto Páez, de CATIE, el análisis estadístico.

LITERATURA CITADA

1. ARIAS, J.W. Evaluación de variedades de maíz de endosperma blanco y amarillo. Tesis Ing. Agr., Universidad de Costa Rica, Facultad de Agronomía, 1970. 63 p.
2. BOLING, M., GROGAN, C.O. y BROYLES, J.W. A new method for artificially producing epiphytotic of *Fusarium* ear rot of maize. Plant Dis. Repr. 47: 315-317. 1963.

3. BOOTH, C. The genus *Fusarium*. England. Commonwealth Mycological Society Institute. 1971. 237 p.
4. CASSINI, R. A propos des dégats provoqués par *Fusarium roseum* Link. Sn. et Hn. dans les cultures de céréales du bassin parisien. Comptes rendus hebdomadaires des Séanc. Acad. Agric. France, 53: 858-867. 1967.
5. COOK, R.J. *Fusarium* rot and foot rot of cereals in the Pacific North-west. *Phytopathology* 58: 127-131. 1968.
6. FOLEY, D.C. The response of corn to inoculation with *Diplodia zeae* and *Gibberella zeae*. *Phytopathology* 50: 146-149. 1960.
7. HOLBERT, J.R. y HOFFER, G.N. Control of the root, stalk and ear rot diseases of Corn. U.S. Department of Agriculture, Farmer's Bulletin 1176, 1920. 24 p.
8. HOOKER, A.L. Associations of resistance to several seedling root, stalk and ear diseases in corn. *Phytopathology* 46: 379-384. 1956.
9. KERR, W.E. Ear and cob rot diseases of maize. *Rodhesia Agric. Journal* 62: 1123. 1965.
10. KINGLAND, D.C. y WERNHAM, C.C. Etiology of stalk rot of Corn in Pennsylvania. *Phytopathology* 52: 519-523. 1962.
11. KOEHLER, B. Natural mode entrance of fungi into corn ears and some symptoms that indicate infection. *Jour. of Agric. Res.* 64: 421-442. 1942.
12. KOEHLER, B. Corn ear rot in Illinois. *Illinois Agric. Exp. Sta. Bull.* 639. 1959.
13. SALAS, C.A. Evaluación de maíces de endosperma blanco y amarillo. *En: Informe Anual de labores realizadas durante el período 1971-72 en la Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno. Universidad de Costa Rica, Facultad de Agronomía.* pp. 47-60.
14. SMITH, F.L. y MADSEN, H.N. Susceptibility of imbred lines of Corn to *Fusarium* ear rot. *Agron. Jour.* 41: 347-348. 1940.
15. SNYDER, W.C. y HANSEN, H.N. Key to the *Fusarium* species. Univ. of California. Dept. of Plant Pathology. Berkeley, California. 1959. 1 p. (mimeo).
16. ULLSTUP, A.J. Method for inoculating corn ears with *Gibberella zeae* and *Diplodia maydis*. *Plant Dis. Repr.* 54: 658-662. 1970.
17. YOUNG, H.C. The toothpick method of inoculating corn for ear and stalk rots. (Abstr.) *Phytopathology* 33: 16. 1943.
18. ZENTENO, Z.M. y OROZCO, J. Estudios sobre hongos patogénicos de la República Mexicana. IV. Prueba de inoculación de mazorcas de maíz con *Fusarium moniliforme*. *Anales del Instituto de Biología, México*, 36: 75-78. 1965.