

AGRONOMÍA COSTARRICENSE

REVISTA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
COLEGIO DE INGENIEROS AGRÓNOMOS
MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERÍA

www.cia.ucr.ac.cr
www.mag.go.cr/rev_agr/index.html



AGRONOMÍA COSTARRICENSE

Revista semestral de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Costa Rica,
El Colegio de Ingenieros Agrónomos,
y el Ministerio de Agricultura y Ganadería

DIRECTOR

Nevio Bonilla Morales
Ministerio de Agricultura y Ganadería
San José, Costa Rica.

EDITORA

Silvia Elena Arce Quesada
Escuela de Economía Agrícola y Agronegocios
Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

ASISTENTE EDITORIAL

Rosibel Serrano Gómez
Centro de Investigaciones Agronómicas
Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

PORTRADA

En relación con el artículo “Caracterización morfogénica para propagación de la vainilla, *Vanilla planifolia Andrews*”,
de Villegas-Ramírez y Palma-Zúñiga.

CONSEJO EDITORIAL

Floria Bertsch Hernández
Universidad de Costa Rica, Costa Rica.
Elizabeth Arnáez Serrano
Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica.
Fernando Mojica Betancur
Colegio de Ingenieros Agrónomos, Costa Rica.
Primo Luis Chavarría
Colegio de Ingenieros Agrónomos, Costa Rica.
Daniel Zúñiga van der Laat
Ministerio de Agricultura y Ganadería, Costa Rica.
Jorge Alberto Elizondo Salazar
Universidad de Costa Rica, Costa Rica.
Mario Villatoro Sánchez
Universidad de Costa Rica, Costa Rica.
Carlos Henríquez Henríquez
Universidad de Costa Rica, Costa Rica.

CONSEJO EDITORIAL ASESOR INTERNACIONAL

Aixa Ofelia Rivero Guerra
European Centre for Applied Statistics S. L., Spain
Alcido Elenor Wander
Embrapa Rice and Beans, Brasil
André Mendes Jorge
Universidade Estadual Paulista – UNESP, Brasil
Beatriz Irene Eibl
Universidad Nacional de Misiones, Argentina
Danilo Pezo
Tropical Agriculture Research and Training Center (CATIE), Perú
Francisco Paulo Chaimsohn
Instituto Agronómico do Paraná, Brasil
Guadalupe Valdovinos Ponce
Colegio de Postgraduados, México
Gustavo J. Lascano
Clemson University, USA
Héctor Horacio Murcia Cabra
Universidad de Santo Tomás (USTA), Colombia
Héctor Mario Andrade Montemayor
Universidad Autónoma de Querétaro, México
Hugo Antonio Tobías Vásquez
Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala
Jorge Etchevers Barra
Colegio de Posgraduados, México
Jorge Hernán Chiriboga Pareja
Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), Brasil
Laura Berta Reyes Sánchez
Universidad Nacional Autónoma de México, México
Martha Nascimento Castro
Faculdade Araguaia, Brasil
Mónica Matilde Barbazán Pacheco
Universidad de la República, Uruguay
Olegario Muñiz Ugarte
Instituto de Suelos del Ministerio de la Agricultura (MINAG), Cuba
Patrice Cannava
Agocampus Ouest, Francia
Renato de Mello Prado
Universidade Estadual Paulista – UNESP, Brasil
Rogelio Nogales Vargas-Machuca
Estación Experimental del Zaidín, España
Raúl E. Jaramillo Vélez
International Plant Nutrition Institute, Ecuador

AGRONOMÍA COSTARRICENSE

ahora en línea

Visite la Revista

www.mag.go.cr/rev_agr/index.html

www.cia.ucr.ac.cr

Los miembros del Consejo Editorial y el Consejo Editorial Asesor Internacional realizan un arbitraje permanente de los trabajos publicados en la Revista Agronomía Costarricense.

Revista Agronomía Costarricense / Centro de Investigaciones Agronómicas.

Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. Teléfono 2511 2080, fax 2234 1627. Correo electrónico: rac.cia@ucr.ac.cr

ISSN 0377-9424

AGRONOMÍA COSTARRICENSE

REVISTA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

COLEGIO DE INGENIEROS AGRÓNOMOS

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERÍA

Volumen 46

2022

Número 1



REVISORES ESPECIALIZADOS

Revisores Nacionales

Adrian Pinto
Adriana Murillo
Alexandra Urbina
Alfredo Alvarado H.
Alfredo Bolaños
Alfredo Durán
Allan González
Alonso Acuña
Álvaro Castro
Álvaro Jiménez C.
Álvaro Ramírez
Amelia Paniagua
Ana Abdelnour
Ana Cecilia Segreda
Ana Gabriela Pérez
Ándres Hernández P.
Anthony Valverde
Antonio Bogantes
Argerie Cruz
Arturo Brenes A.
Bernal Azofeifa
Bernal Herrera
Bernal Rodríguez
Bernal Valverde
Bernardo Vargas
BK Singh
Bryan Alemán
Carlos Alfaro
Carlos Alpízar
Carlos Henríquez
Carlos Luis Loria
Carlos Luna T.
Carlos Méndez
Carlos Pomareda
Carlos Ramírez M.
Carlos Rodríguez V.
Carmela Velásquez
César Rodríguez
Claudia Charpentier
Claudia Fernández
Claudia Martínez
Cristina Chinchilla
Cristina Vargas
Cristóbal Villanueva
Daniel Saborio
David Mora
Denis Hine
Dennis León
Diego Berrocal
Diógenes Cubero
Dora Flores
Douglas Marín
Edgar Aguilar
Edgar Alvarado
Edgar Gutiérrez
Edgar Rojas
Edgar Vidal
Edgardo Alpízar
Eduardo Barrantes
Eduardo Salas
Edwin Esquivel
Edwin Orozco
Elizabeth Arnáez
Eloy Molina
Emerson Herrera
Enrique Ulloa
Eric Guevara
Eric Mora N.
Eugenio Corea
Eugenio González
Federico Albertazzi
Felipe Arauz C.
Felipe Arguedas
Fermín Subirós R.
Fernando Araya

Florencia Antillón
Francisco Arguedas
Francisco Mesén
Francisco Romero
Francisco Saborío
Franklin Herrera
Freddy Soto
Geiner Matamoros
Geovanny Garro
Gerardina Umaña
Gerardo Ávalos
Gilbert Barrantes
Gilberto Cabaleceta
Gloria Meléndez
Guillermo Araya
Gustavo Fallas
Gustavo Quesada
Héctor Medrano
Helga Blanco M.
Hernán Castro E.
Hugo Aguiral
Ileana Moreira
Isabel Carpio M.
Ismael Hernández
Jenny Reynolds
Johan Lotz A.
Johnny Montenegro
Jorge Camacho
Jorge C. Rodríguez
Jorge Elizondo
Jorge Leiva
Jorge Mora B.
Jorge Sandoval
Jorge Segura
José Bejarano
José L. Corrales
José P. Jiménez
José Valerín
Juan Araya
Juan Carlos Madrigal
Juan José Romero
Juan Luis Fallas
Juan Luis Morales
Juan Manuel Hernández
Juan Mora
Juan R. Navarro
Julieta Carranza
Julio Arias
Julio Mata
Julio Rodríguez
Karolina Villagra
Kenneth Largaespada
Kenneth Madriz
Laura Segura
Laura Solis
Lea Wexler
Leida Castro
Leslie Medina
Lidieth Uribe
Lisela Moreira
Lolita Durán
Lorena Flores
Lorena Uribe
Luis Barboza
Luis Brenes Q
Luis Calvo
Luis Carrera
Luis Diego Arroyo
Luis Vargas
Luis Villalobos
Luko Hilje
Manuel Camacho
Manuel Masís
Marco Adamson
Marco Lobo
Marco V. Sáenz

Marcos Chaves
María Isabel González
Maricruz Ramírez
Mario Araya
Mario Arias
Mario Morales
Mario Piedra
Mario Saborio
Mario Villatoro
Marta Montero
Marta Valdés M.
Marvin Araya
Marvin Vargas
Marvin Villalobos
Milagro Granados
Milton Villarreal
Mónica Blanco
Natalia Barboza
Natalia Soto
Néstor Chaves
Olga Calvo
Olman Murillo
Orlando Carrillo
Orlando Chinchilla
Oscar Acuña
Oscar Castro
Oscar Obando
Oscar Quesada
Patricia Quesada
Patricia Ramírez
Paul Esker
Rafael Arguello
Rafael Mata
Rafael Salas C.
Rafael Segura
Ramiro Alizaga
Ramón Mexzón
Randall Chacón
Randy Chinchilla
Raúl Botero
Rebeca Zamora
Renato Jiménez
Ricardo Piedra
Roberto Azofeifa
Roberto Camacho
Roberto Ramírez
Roberto Villalobos
Roddy Ortega
Rodolfo Araya
Rodrigo Jiménez
Rodrigo Rosales
Roger Fallas
Roger Molina Coto
Roger Muñoz
Ronald Chaves
Ronald Vargas
Roy Artavia
Rubén Calderón
Rubén Ortiz
Ruth de la Asunción
Ruth León G.
Sergio Abarca
Susana Cascante
Sisgo Acuña
Víctor Hugo Porras
Victoria Artronis
Victoria García
Vidal Vega
Viviana Madrigal
Walter Marín M.
Walter Peraza
Walter Quiros
Werner Rodríguez
Wilbert Phillips
William Hernández
William Meléndez

William Rivera
William Sánchez
Wilson Beita
Yannery Gómez

Revisores Internacionales

Abellino Pitty (Honduras)
Adriana Escudero (España)
Adriana Murillo (EE.UU.)
Ana Scopel (Argentina)
André Finkler (Brasil)
Aura Morales (El Salvador)
Beatriz Eibl (Argentina)
Bernardo Villegas (Colombia)
Carolina Zamorano (Colombia)
Césáreo Rodríguez H. (México)
Corina Bernigaud (Uruguay)
Consuelo Estevez (Puerto Rico)
Daniel Carreira (Argentina)
Edgar Amezquita (Colombia)
Emilio Olivares Sáenz (México)
Enrique Comat (Colombia)
Florencia Montaginini (EE.UU.)
Francisco Coll (Cuba)
Francisco Ibarra (México)
Francisco P. Chaimsohn (Brasil)
Guadalupe Valdovinos (Puerto Rico)
Guillermo Reyes (Nicaragua)
Héctor Mario Andrade (México)
Hernán Chiriboga (Ecuador)
Hugo del Cid H. (Guatemala)
Ildefonso Pla Sentís (España)
Jaime Garzón (Colombia)
Jorge Etcheverry (México)
José L. Barrera Violet (Colombia)
José M. Tapia (México)
José Moure (España)
Juan Carlos Rosas (Honduras)
Juan F. Gallardo (España)
Juan Francisco Barrera (México)
Juan Pedro Agostini (Argentina)
Julián F. Becerra (Colombia)
Kellen Gatti (Colombia)
Lérida Almaguel (Cuba)
Leopoldo Álvarez (Argentina)
Luis Castresana (España)
Luis Felipe Lata (Brasil)
Manuel Reigosa (España)
Manuel Sandoval (México)
Marta Nascimento (Brasil)
Mauricio Arango (Colombia)
Miguel Marchamalo (España)
Nolver Arias Arias (Colombia)
Olegario Muñiz Ugarte (Cuba)
Óscar A. Guzmán P. (Colombia)
Óscar G. Campos (Guatemala)
Ramiro Ramírez P. (Colombia)
Raúl Zapata (Colombia)
Roberto Fernández (Argentina)
Roberto Ferreira (Brasil)
Rolando Cifuentes (Guatemala)
Ronald Ochoa (EE.UU.)
Rubén Cabanillas Cruz (México)
Santiago M. Sáenz (Colombia)
Sergio Hernández (México)
Tania Mulkay (Cuba)
Thomas J. Smyth (EE.UU.)
Víctor Hugo Porras (Colombia)
Víctor Ordaz Chaparro (México)
Yisa María Ochoa (México)
Yolanda Moguel (México)

AGRONOMÍA COSTARRICENSE

REVISTA EN LÍNEA

Si desea visitar la Revista Agronomía Costarricense puede hacerlo a través del **Ministerio de Agricultura y Ganadería** http://www.mag.go.cr/rev_agr/index.html y el **Portal de Revistas Académicas de la Universidad de Costa Rica** <http://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agrocost> Centro de Investigaciones Agronómicas www.cia.ucr.ac.cr

También puede encontrarla en los siguientes índices internacionales:

	LATINDEX (Sistema Regional de Información en Línea para Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal)
	REDALYC (Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal)
	SciELO (Scientific Electronic Library Online)
	SIDALC (Sistema de Información y Documentación Agropecuaria de las Américas)
	INIS Atomindex (International Nuclear Information System)
	Base AGROC
	DIALNET
	DOAJ (Directory of Open Access Journals)
	AGRIS
	REDIB (Red Iberoamericana de Innovación y Conocimiento Científico)
	PERIÓDICA (Índice de Revistas Latinoamericanas de Ciencias)
	Ulrich's
	OCLC World Cat
	CAB Abstracts



COPAC



ROAD (Directory of Open Access Scholarly Resources)



Food and Agriculture Organization of the United Nations

FAO Online Catalogues



SHERPA/RoMEO

SHERPA/RoMEO



Organization for Tropical Studies

Organization for tropical studies



GALE
A Cengage Company

Gale (Cengage Company)



Dirección General de Bibliotecas



DGB UNAM



CONRICyT

Consortio Nacional de Recursos de Información Científica y Tecnológica

CONRICyT (Consortio Nacional de Recursos de Información Científica y Tecnológica)



NACIONES UNIDAS



CEPAL

CEPAL (Comisión Económica para América Latina y el Caribe)



LA Referencia

Red de repositorios de acceso abierto a la ciencia

LA Referencia (Red de repositorios de acceso abierto a la ciencia)



ZOOLOGICAL RECORD

Zoological Record



EBSCO
Academic Search Complete

Academic Search Complete



MIAR

MIAR (Matriz de Información para el Análisis de Revistas)



Sabio

SABIO



sudoc

SUDOC

CANJES

Universidad de Costa Rica
Sistema de Bibliotecas, Documentación e Información
Unidad de Selección y Adquisiciones
-CANJE
Ciudad Universitaria Rodrigo Facio
Costa Rica

DIRECCIÓN

REVISTA AGRONOMÍA COSTARRICENSE

Centro de Investigaciones Agronómicas
Universidad de Costa Rica
San José, Costa Rica
Teléfono 2511-2080
Fax 2234-1627
Correo electrónico: rac.cia@ucr.ac.cr

CORRESPONDENCIA Y SUSCRIPCIONES

Editorial Universidad de Costa Rica
administracion.siedin@ucr.ac.cr
www.editorial.ucr.ac.cr
Apartado Postal 11501
2060 Ciudad Universitaria Rodrigo Facio
Costa Rica

Número suelto:

Costa Rica ¢ 3060.00 incluye el 2% de IVA

Suscripción anual:

Costa Rica	¢ 8160.00
América Latina,	
Asia y África	US\$ 20.40
Resto del mundo	US\$ 71.40

AGRONOMÍA COSTARRICENSE

Revista semestral de ciencias agrícolas de la Universidad de Costa Rica, el Colegio de Ingenieros Agrónomos y el Ministerio de Agricultura y Ganadería.

VOLUMEN 46

2022

NÚMERO 1

Artículos científicos

Caracterización morfogénica de la vainilla (<i>Vanilla planifolia</i> Andrews) para su propagación	9-24
<i>Juan Villegas-Ramírez y Tomás Palma-Zúñiga</i>	
Diagnóstico foliar de nutrientes de nueve especies forestales tropicales de tres pisos altitudinales en Centro América	25-45
<i>Alfredo Alvarado-Hernández, Ronald Chaves-Corea, Eduardo Chacón-Madrigal, Wilberth Rodríguez-Alfaro y Freddy Blanco-Montero</i>	
Estudio preliminar de especies de <i>Fusarium</i> presentes en piña (<i>Ananas comosus</i>) en Costa Rica . .	47-64
<i>Mónica Blanco-Meneses, Oscar Castro-Zúñiga y Gerardina Umaña-Rojas</i>	
Nivel de infección del microsporidio <i>Nosema</i> spp. en colmenas de abejas africanizadas y su relación con la precipitación y humedad relativa	65-75
<i>Rafael A. Calderón-Fallas y Eduardo Moreno-Morales</i>	
“UCR 55” variedad de frijol común mesoamericano de grano negro	77-94
<i>Rodolfo Araya-Villalobos, Néstor Felipe Chaves-Barrantes, Juan Carlos Hernández-Fonseca y Carlos Cordero-Morales</i>	
Flujos de óxido nitroso en pasturas bajo diferentes dosis de fertilización nitrogenada, Norte de Colombia	95-109
<i>José Luis Contreras-Santos, Manuel Ramón Espinosa-Carvajal, Jorge Cadena-Torres, Judith Martínez-Atencia, Cindy Katherine Falla-Guzmán y Jeyson Fernando Garrido-Pineda</i>	
Caracterización cultural-morfométrica como herramienta para la identificación de <i>Fusarium</i> spp., asociado a <i>Nicotiana tabacum</i> L.	111-128
<i>Oandis Sosa-Sánchez, Mirella Romero-Bastidas, Juan José Silva-Pupo, Ramiro Remigio Gaibor-Fernández, Sergio Florentino Rodríguez-Rodríguez y Wilson Geobel Ceiro-Catasú</i>	

Notas técnicas

- Pseudomonas* sp en la emergencia de semillas y el desarrollo de posturas de cacao 129-134
Yusdel Ferrás-Negrín, Carlos Alberto Bustamante-González y Nosleiby Ortíz-Gómez
- Servicio ecosistémico de regulación de un bosque de galería del Arroyo San Lorenzo,
Paraguay 135-146
*Maura Isabel Díaz-Lezcano, Manuel David Rodríguez-Benítez, Higinio Moreno-Resquín
y Cristian Andrés Britos-Benítez*

CARACTERIZACIÓN MORFOGÉNICA DE LA VAINILLA (*Vanilla planifolia* ANDREWS) PARA SU PROPAGACIÓN*

Juan Villegas-Ramírez^{1/**}, Tomás Palma-Zúñiga²

Palabras clave: *Vanilla planifolia*; Biorreactores de Inmersión Temporal; multiplicación, organogénesis.

Keywords: *Vanilla planifolia*; Temporary Immersion Bioreactors; multiplication; organogenesis.

Recibido: 16/02/2021

Aceptado: 08/09/2021

RESUMEN

Introducción. La vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews) es una orquídea que se cultiva comercialmente para la producción de vainillina, una sustancia saborizante que se emplea principalmente en la industria alimenticia y como cosmético. Aunque la demanda ha motivado su cultivo, hay poca disponibilidad de semilla vigorosa y libre de enfermedades lo cual ha sido una limitante. Se ha demostrado que los sistemas de inmersión temporal son eficientes. Para la micropropagación masiva de la vainilla, aún no se han establecido estudios de tiempo, frecuencia de inmersión y volumen óptimo en la proliferación de brotes en Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT) y además se desconoce una ruta morfogénica que garantice la estabilidad genética y la optimización durante el proceso de micropropagación. **Objetivo.** Caracterización morfogénica de la vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews) en un BIT. **Materiales y métodos.** Se realizaron 3 experimentos, cada uno con 3 tratamientos. Para el primer experimento, se consideraron tiempos de 5, 10 y 15 min para los tratamientos, en el

ABSTRACT

Morphogenic characterization of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) for propagation. **Introduction.** Vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) is an orchid that is commercially grown for the production van, a flavoring substance that is used mainly in the food industry and as a cosmetic. Although the demand has motivated its cultivation, there is little availability of vigorous seed and free which has been a limited. Temporary immersion systems have been shown to be efficient. For their massive micropropagation but studies of time, immersion, frequency and optimal volume have not yet been established in the proliferation of shoots in Temporary Immersion Bioreactors (BIT), furthermore, a morphogenic pathway that guarantees genetic stability and optimization during the micropropagation process is unknown. **Objective.** Morphogenic characterization of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) in a BIT. **Materials and methods.** Three experiments were carried out, each with 3 treatments. For the first experiment, the immersion time considered

* Investigación producto de la Maestría en Ciencia y Tecnología para la Sostenibilidad, del programa de posgrado del Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo (DOCINADE).

** Autor para correspondencia. Correo electrónico: juan7villegas@estudiantec.cr

1 Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), Escuela Técnica Agrícola e Industrial (ETAI), Santa Clara, San Carlos, Costa Rica.

 0000-0001-9490-3507.

2 Escuela Técnica Agrícola e Industrial (ETAI), Centro de Investigación en Agroindustria, Biotecnología y Veterinaria (CIABIV), Santa Clara, San Carlos, Costa Rica.

 0000-0002-2862-7003.

segundo se evaluaron 3 frecuencias en tiempos de 6, 12 y 18 horas y en el tercero se consideraron 20, 30 y 40 ml/explant como volumen de medio de cultivo. Para los diferentes tratamientos se utilizaron 5 repeticiones, con una unidad experimental de 10 explantes y segmentos de tallo con 3 yemas axilares. El medio de cultivo consistió en las sales de Murashige Skoog (MS) suplementado con 1 mg.L⁻¹ de BA y 1 g.L⁻¹ de caseína. El fotoperíodo se ajustó a 16 horas luz, con una temperatura de 27°C±3 y una humedad relativa de 80% **Resultados.** Se obtuvieron diferencias estadísticas ($p<0,05$) respecto a los tiempos evaluados, frecuencia de inmersión y el volumen por explante. Se determinó como mejor tiempo de inmersión un periodo de 15 minutos, 6 horas como frecuencia de inmersión y 40 ml como volumen de medio por explante. Al comparar la respuesta de desarrollo, el sistema BIT superó al medio semisólido 1,8 veces en el número de brotes y 4 veces en el incremento de peso fresco. También con BIT se obtuvieron 36 brotes por explante mientras que en el sistema de cultivo en medio semisólido, se obtuvieron 20 brotes por explante. **Conclusiones.** Mediante el empleo del sistema BIT, se optimizó el mecanismo de micropagación de *V. planifolia* comparado con el medio de cultivo semisólido en la ruta organogénica directa, lo cual fue demostrado con la formación de brotes preformados y brotes adventicios.

the treatments of 5, 10 and 15 min, in the second experiment 3 frequencies were evaluated at times of 6, 12 and 18 hours and in the third experiment were considered 20, 30 and 40 ml/explant as volume of culture medium. For the different treatments used 5 repetitions, with an experimental unit of 10 explants and stem segments with 3 axillary buds. The culture medium consisted of Murashige Skoog (MS) salts supplemented with 1 mg.L⁻¹ of BA and 1 g.L⁻¹ of casein. The photoperiod was adjusted to 16 light hours, with a temperature of 27°C±3 and a relative humidity of 80%. **Results.** Statistical differences ($p<0,05$) were obtained with respect to the evaluated times, frequency of immersion and the volume per explant. A period of 15 minutes it was determined as the best immersion time, 6 hours as the immersion frequency and 40 ml as the volume of medium per explant. When comparing the development response, the BIT system exceeded the semisolid medium 1.8 times in the number of shoots and 4 times in the increase in fresh weight. In addition, 36 shoots were obtained per explant in BIT, while in the culture system in semi-solid medium, a multiplication rate of 20 shoots per explant. **Conclusions.** By using the BIT system, the micropagation mechanism of *V. planifolia* was optimized compared to the semi-solid culture medium in the direct organogenic route, which was proved with the formation of preformed shoots and adventitious shoots.

INTRODUCCIÓN

El género *Vanilla* está representado por un grupo de lianas que comprende 126 especies pertenecientes a la familia Orchidaceae (Damian y Mitidieri 2020, Azofeifa-Bolaños *et al.* 2019, Soto y Dressler 2010, Bory *et al.* 2008). Según Gelski (2019). En los últimos años se incrementó la demanda de la vainilla a nivel mundial, sin

embargo, la oferta del cultivo ha sido escasa y como consecuencia ha generado precios hasta de 600 dólares por kg, aspecto de interés para productores. Granados (2018) señaló que la oferta de vainilla de Madagascar, principal país productor del cultivo en el mundo, disminuyó en un 38% desde el 2017, debido a la afectación sufrida por el huracán Henawo.

Sin embargo, también se deben atender otros aspectos como su propagación, la cual se puede realizar tanto por el método sexual como asexual, aunque el primero es menos eficiente, debido a que es común que las semillas presenten un bajo porcentaje de germinación (Yeh *et al.* 2021). El método asexual o por esquejes de tallos requiere alta mano de obra y disponibilidad de más tiempo, lo cual incrementa costos y reduce la viabilidad de este tipo de proyecto (Azofeifa 2014). Por lo general las plantaciones establecidas por esquejes se ven afectadas por diversas enfermedades principalmente por la marchitez provocada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*, que ocasiona necrosis de raíces y tallos (Adame *et al.* 2015).

Con el interés de abastecer la demanda del cultivo, a partir del uso de genotipos de vainilla de alto rendimiento, resistentes a *Fusarium oxysporum* f.sp. *vanillae* (Iglesias-Andreu 2018), se ha trabajado con técnicas de micropagación in vitro o propagación clonal bajo condiciones controladas de laboratorio.

Se han publicado protocolos de micropagación para producir masivamente plantas de vainilla libres de plagas y enfermedades mediante organogénesis procedentes de yemas axilares (George y Ravishankar 1997), asimismo por embriogénesis somática y organogénesis mediante la inducción del callo (Janarthanam y Sheshadri 2008). Otras investigaciones con técnicas de micropagación en el cultivo in vitro en vainilla, citan el trabajo de Philip y Nainar (1986) en el desarrollo de terminales de raíz a meristemos vegetativos, posteriormente, mediante los estudios se ha identificado que el estímulo directo de reguladores de crecimiento como la benziladenina se han utilizado para explantes de ápices del tallo (Abebe *et al.* 2009, Gantait *et al.* 2009, Tan *et al.* 2013). También la adición de reguladores del crecimiento como el ácido naftalenacético (NAA) y la 6-bencilaminopurina (BAP) en el medio de cultivo MS es frecuente en la micropagación de la vainilla (Murashige y Skoog 1962). También se conoce que la utilización de aditivos como lo es lignosulfonato de

calcio (Ca-LIGN) y el lignosulfonato de sodio (Na-LIGN) sobre la multiplicación y regeneración del cultivo a partir de brotes de *V. planifolia* (Abdullah *et al.* 2020).

A pesar de los beneficios de la micropagación en medios semisólidos para la obtención de plantas libres de enfermedades, han surgido limitaciones debido a la necesidad de realizar subcultivos frecuentes cuando el medio de cultivo se agota. Además, los volúmenes de medio de cultivo en medios semisólidos son relativamente pequeños pues han presentado rangos entre 10 a 30 ml/explantado según el frasco de cultivo, y más requerimiento de mano de obra, que a su vez genera problemas de contaminación por manipulación, en conjunto aspectos por los cuales se consideró como alternativa, el uso de Sistemas de Inmersión Temporal (SIT). Estos son sistemas automatizados en medio líquido que garantizan la oxigenación, permiten minimizar los costos de producción y la contaminación por manipulación; además proporcionan contacto uniforme en todo el explante, aspecto que favorece la sustitución del medio de cultivo líquido sin remplazar el frasco (Watt 2012). Sin embargo, investigaciones realizadas con el SIT en vainilla, no reportan respuestas morfogénicas durante la micropagación y requieren ser identificadas con el fin de optimizar los factores químicos y físicos que las controlan. Y asimismo, garantizar la estabilidad genética de las plantas obtenidas in vitro (Alatorre 2002, Palama *et al.* 2010).

El SIT se ha diseñado y modificado con la utilización de diferentes tipos de frascos y diferentes mecanismos que impulsan el medio de cultivo mediante agitación mecánica o neumática. Los diseños de SIT fueron expuestos y descritos en detalle por Etienne y Berthouly (2002) y Paek *et al.* (2001), Paek *et al.* (2005).

También la eficiencia de los Sistemas de Inmersión Temporal ha sido motivo de una revisión de literatura por parte de Georviev *et al.* (2014) quien se refirió al funcionamiento de esos sistemas, y su diseño tecnológico, mediante ejemplos de la aplicación de estos sistemas en

micropropagación de plantas tanto a nivel de laboratorio como en terrenos para su producción.

Ramírez-Mosqueda e Iglesias-Andreu (2016) evaluaron 3 diferentes sistemas de inmersión temporal para micropropagar la vainilla: Biorreactores de inmersión temporal (BIT®), Biorreactores de inmersión por gravedad (BIG) y receptor para inmersión temporal automatizada (RITA®). Los resultados obtenidos reportaron mayor número de brotes/explantantes (18,06) obtenidos en BIT®, seguido de RITA® (12,77) y BIG (7,83), sin embargo, esta investigación no indicó el tiempo, la frecuencia y tampoco el volumen de medio/explantantes específicos para los BIT. Tanto la frecuencia como el volumen de medios usados en BIT han sido los recomendados para su análisis por Ramos-Castellá *et al.* (2014) para el sistema RITA®.

Para el presente estudio en particular, se utilizó el Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT), propuesto por Escalona *et al.* (1999).

El objetivo fue investigar caracterización morfogénica de la Vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews) mediante un biorreactor de inmersión temporal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material experimental. Se utilizaron plántulas in vitro de *Vanilla planifolia*, procedentes del laboratorio de Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica, Sede Regional de Santa Clara, San Carlos. Las yemas axilares provenían de las plántulas in vitro que fueron subcultivadas 3 veces con 30 días de intervalo para obtener plántulas de aproximadamente 10 cm de longitud; luego se seleccionaron como explante los segmentos de tallo de las plántulas in vitro conteniendo 3 yemas axilares de 5 cm de longitud.

Medio de cultivo. Se utilizaron 2 medios de cultivo, el primero con las sales Murashige y Skoog 1962 (MS) solidificado con Agar (4,4 g.L⁻¹) y el segundo medio preparado para el BIT con las sales MS carente de agar. Ambos tipos de

medio de cultivo contenían las sales y vitaminas MS y fueron enriquecidos con 30 g.L⁻¹ de sacarosa y suplementado con 1 mg.L⁻¹ de bencil adenina (BA), 1 mg.L⁻¹ caseína y 1 ml.L⁻¹ de Plant Preservative Mixture™ (PPM) como prevención al ataque de bacterias y hongos. El pH se ajustó a 5,7 y posteriormente se esterilizó en autoclave durante 29 minutos por litro de medio de cultivo, a una temperatura de 121°C y una presión de 15 psi (Palma 2013).

Tratamientos para evaluar la respuesta de vainilla en un Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT). Para determinar las respuestas de la vainilla en BIT®, se realizaron 4 experimentos y se seleccionó el que presentó el mayor número de brotes durante su multiplicación según el tiempo y frecuencia de inmersión así como el volumen de medio. Posteriormente se evaluó la respuesta de los explantantes de vainilla mediante comparación del sistema BIT® con el método convencional en medio semisólido. En cada uno de los primeros 3 experimentos se evaluaron 3 tratamientos con 5 repeticiones semanalmente durante 6 semanas. Los mismos se describen a continuación.

Experimento 1. Tiempo de inmersión.

Los tratamientos evaluados fueron: 5, 10 y 15 minutos. En esta etapa de multiplicación, el volumen fue de 300 ml por unidad BIT® (30 ml por explante) como constante. La frecuencia de inmersión utilizada como constante fue de 12 horas. Se utilizaron 10 explantes por recipiente de cultivo, con 5 repeticiones y se evaluaron semanalmente durante 6 semanas.

Experimento 2. Frecuencia de inmersión.

Se evaluaron 3 frecuencias de inmersión para los siguientes tratamientos: cada 6, 12 y 18 horas. Se utilizaron 10 minutos como mejor tiempo de inmersión según los resultados obtenidos en el experimento 1 y se estableció como constante el volumen de 30 ml/explantante, 10 explantes formaron la unidad experimental y cada tratamiento fue replicado 5 veces.

Las evaluaciones se realizaron semanalmente durante 6 semanas.

Experimento 3. Volumen del medio de cultivo. En esta etapa se evaluaron 3 volúmenes de medio: 20, 30 y 40 ml por explante. El tiempo y la frecuencia de inmersión se seleccionaron de los experimentos 1 y 2, donde se cuantificaron los mejores resultados en las variables evaluadas. Para cada tratamiento se utilizaron 5 repeticiones. La unidad experimental se conformó con 10 explantes. Las variables se evaluaron semanalmente durante 6 semanas.

Experimento 4. Evaluación de medios de cultivo en BIT vs medios solidificados. Una vez culminados los 3 experimentos, con tiempo de inmersión, frecuencia de inmersión y volumen de medio, se procedió a realizar la comparación de resultados obtenidos en el sustrato semisólido y el medio líquido en BIT, según las mejores respuestas de tiempo y frecuencia de inmersión y el volumen de medio. Las variables también se evaluaron semanalmente durante 6 semanas.

Condiciones físicas del cuarto de crecimiento. En los 4 experimentos la temperatura del cuarto de crecimiento se reguló mediante aire acondicionado a $27\pm3C^{\circ}$; la intensidad lumínica fue de 3000 lux, el fotoperiodo fue de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad; la humedad relativa presentó un valor de 80% en promedio.

Análisis diseño experimental. Para los 3 primeros experimentos se utilizó un diseño completamente al azar con 4 repeticiones y los datos se procesaron estadísticamente con el sistema de análisis estadístico SAS. Se realizó un análisis de

varianza (ANOVA) y los resultados se ajustaron a una ecuación de regresión. El cuarto experimento se analizó mediante la prueba de t student para determinar la respuesta de los explantes de vainilla en medio semisólido de cultivo en BIT®.

Variables evaluadas. Las variables evaluadas cada semana y durante 6 semanas, fueron el número de brotes, longitud de brote (cm), número de hojas del brote, longitud de la lámina foliar del brote (cm), número de raíces, longitud de raíces (cm) e incremento de peso (g).

Histología. Los brotes de *V. planifolia* se fijaron en formaldehído: ácido acético, alcohol, ácido acético (FAA) (1:1:8 v/v), durante 4 días, se deshidrataron en una serie ascendente de alcoholos hasta llegar a xileno y luego la infiltración en paraplast de Fisherbrandt™. Se cortaron secciones delgadas de 10 μ m mediante un micrótomo rotatorio (Leica RM2125 RTS). La tinción se hizo con verde CFC y safranina para observarlos al microscopio compuesto (Optima G302).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del tiempo de inmersión temporal de los BIT en explantes de *Vanilla planifolia*. El análisis de varianza mostró diferencias significativas y altamente significativas para las variables número de brotes y longitud de raíces respectivamente, evaluadas 6 semanas después de la siembra como respuesta al tiempo de inmersión. La mayor respuesta en el número de brotes se evidenció en el tratamiento de 15 min de inmersión con 29,14 brotes y la mayor longitud de raíces (20 mm) se obtuvo con este mismo tratamiento (Tabla 1).

Tabla 1. Multiplicación de *Vanilla planifolia* en BFT con 3 tiempos de inmersión, semana 6 después de la siembra.

Fuente de variación	Número de brotes	Longitud de brotes (cm)	Número de hojas foliar (cm)	Longitud lámina foliar (cm)	Número raíces	Longitud raíces(cm)	Incremento de peso fresco (g)
5 min	22,88	2,14	2,61	1,60	11,84	1,40	3,25
10 min	26,01	2,17	4,74	1,73	12,11	1,73	4,50
15 min	29,14	2,20	6,87	1,86	12,369	2,06	5,75
Ecuación regresión	$Y=3,13X+19,75$						
R ²	0,36						
Fuentes de variación							
Trat	74,08*	0,22NS	18,58NS	0,13NS	27,58NS	0,43**	6,25NS
Error	14,64	0,08	6,69	0,10	15,69	0,03	3,58
Gl trat	2	2	2	2	2	2	2
Gl error	8	8	8	8	8	8	8
Coef. Varia.	13,38	12,61	13,50	21,93	27,63	11,11	58,00

* diferencia significativa para $p<0,05$, $n=10$.
 ** diferencias altamente significativas para $p<0,001$, $n=10$.

Para definir el mejor tiempo de inmersión se consideraron las variables con diferencias significativas ($p<0,05$) y altamente significativas ($p<0,01$) y se ajustaron a un modelo de regresión lineal, lo que confirmó que el tiempo de inmersión influye en el número de brotes y la longitud de raíces de vainilla en BIT®.

Adicionalmente, los frascos gemelos (BIT®) que fueron propuestos por Escalona *et al.* (1999), (Watt 2012) esclarecieron que la duración y frecuencia de inmersión constituyen los factores más importantes para una micropagación exitosa, ya que influyen en la absorción de nutrientes y agua aspecto que también se asocia a la hiperhidridad de los tejidos cultivados (Escalona *et al.* 2006).

También los trabajos de micropagación en sistemas de inmersión temporal en vainilla han sido realizados en recipientes conocidos como RITA® con la aplicación de 2 minutos de inmersión y con diferentes tipos explantes tal y como lo indican las publicaciones, González (2003) mencionó que el uso de yemas axilares y yemas terminales vainilla; Ramos-Castellá *et al.* (2014) quienes utilizaron segmentos nodales de vainilla; Ramírez-Mosqueda *et al.* (2016) utilizaron “cluster” provenientes de yemas axilares y Spinoso-Castillo (2017) iniciaron la micropagación en sistemas de inmersión por medio de segmentos nodales provenientes de yemas axilares. Un trabajo de micropagación en vainilla similar a los biorreactores lo realizaron Sreedhar *et al.* (2009) con “cluster” de explantes en medios líquidos en agitación. Se identificó que el tiempo de inmersión utilizado en sistemas de inmersión

temporal varía de manera importante según la especie y del tipo de sistema de inmersión temporal que se seleccionara para la micropagación de plantas (Georgiev *et al.* 2014).

Para la micropagación de vainilla se utilizaron 3 tipos de sistemas de inmersión temporal a saber: Biorreactores de inmersión temporal (BIT®), biorreactores de inmersión por gravedad (BIG) y receptor para inmersión temporal automatizada (RITA®) con un protocolo propuesto por Ramos-Castellá *et al.* (2014), la mayor de brotes por explante los obtuvo en el medio de cultivo de BIT® con 18,6 brotes, seguido de RITA® con 12,77 brotes y por último el BIG con 7,83 brotes (Ramírez Mosqueda *et al.* 2016). La máxima cantidad de brotes de vainilla obtenidos en este estudio fue de 29,14 brotes (Tabla 1) cuando los explantes fueron sometidos al tratamiento de 15 minutos de inmersión, valor superior al número de brotes /explante de vainilla obtenidos por Ramos Castellá *et al.* (2014) (18,6 brotes/explante) con el BIT® como sistema de inmersión temporal.

Efecto de la frecuencia de inmersión de los BIT en explantes de *V. planifolia*. En el estudio de la frecuencia de inmersión el análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas para las variables número de brotes y número de hojas evaluados 6 semanas después de la siembra. El mayor número de brotes y hojas, 33,7 y 34,73 respectivamente se obtuvo con una frecuencia de inmersión de cada 6 horas y decreció conforme disminuía el contacto con el medio de cultivo (Tabla 2).

Tabla 2. Multiplicación de *Vanilla planifolia* en BTT con 3 frecuencias de inmersión en la semana 6 después de la siembra.

Fuente de variación	Número de brotes	Longitud de brotes (cm)	Número hojas	Longitud lámina foliar (cm)	Número raíces	Longitud raíces (cm)	Incremento de peso fresco (g)
Cada 6 horas	33,7	2,51	34,73	1,51	10,13	0,64	8,6
Cada 12 horas	28,9	2,46	29,13	1,35	9,33	0,69	7,82
Cada 18 horas	24,1	2,41	23,53	1,19	8,53	0,74	7,04
Ecuación regresión		$Y = -4,8X + 38,5$		$Y = -5,6X + 40,33$			
R ²	0,74		0,67				
Fuentes de variación							
Trat	115,8**	0,014NS	161,07***	0,013NS	4,87 NS	0,014NS	3,04NS
Error	5,13	0,207	8,73	0,074	5,28	0,09	2,30
GI trat	2	2	2	2	2	2	2
GI error	8	8	8	8	8	8	8
Coeficiente de variación	7,76	11,48	19,52	19,52	28,97	42,42	20,55

* diferencia significativa para p<0,05. n=10.

** diferencias altamente significativas para p<0,001. n=10.

Las variables longitud de brotes, longitud de lámina foliar número de raíces y longitud de raíces e incremento de peso fresco, no mostraron diferencias estadísticas a las 6 semanas de evaluadas después de la siembra.

Resultados similares encontraron Basail *et al.* (2012) al evaluar el tiempo y frecuencia de inmersión en la micropropagación de plátano, ya que ambas variables, influyeron en la absorción de nutrientes y agua con afectación del coeficiente de multiplicación y la calidad de las plantas micropagadas. La frecuencia de inmersión varió según la especie estudiada, el sistema de inmersión temporal empleado y la ruta de morfogénesis tal y como lo demuestra la revisión de Watt (2012), quien estableció las frecuencias de inmersión entre 30 segundos cada 10 minutos en (*Eucalyptus grandis*) y en sistemas RITA® (McAlister *et al.* 2005) y hasta 30 minutos cada 4 horas en el cultivo de *Lessertia frutescens* en

un biorreactor de inmersión temporal mediante burbujeo, B.I.B®, (Shaik *et al.* 2010). En las investigaciones realizadas por Ramos *et al.* (2014), Ramírez *et al.* (2014), Spinoso-Castillo *et al.* (2017), González (2003) en sistemas de inmersión tipo RITA® en *Vainilla planifolia* se determinó una frecuencia de inmersión de 4 horas.

Efecto del volumen de medio de los BIT en explantes de *Vanilla planifolia*. Una vez determinado el tiempo y frecuencia de inmersión se evaluó el volumen de medio por explante, el cual mostró diferencias altamente significativas en las variables número de brotes, longitud de brotes, número de hojas e incremento de peso fresco, evaluadas 6 semanas después de la siembra (Tabla 3). Las variables longitud de lámina foliar, número y longitud de raíces no presentaron diferencias estadísticas durante ese tiempo de evaluación.

Tabla 3. Multiplicación de *Vanilla planifolia* en BTT® con 3 volúmenes de medio por explante, semana 6 después de la siembra.

Fuente de variación	Número de brotes	Longitud de brotes (cm)	Número hojas	Longitud lámina foliar (cm)	Número raíces	Longitud raíces (cm)	Incremento de peso fresco (g)
20 ml	24,33	2,08	18,26	0,94	6,70	0,77	11,79
30 ml	29,63	1,92	22,06	1,22	6,40	0,67	17,00
40 ml	34,93	1,76	25,86	1,5	6,10	0,57	22,21
Ecuación regresión	$Y=5,30 X+19,03$	$Y=-0,16 X + 2,24$	$Y=3,8 X + 14,46$				$Y=5,21 X+6,58$
R ²	0,75	0,65	0,76				0,65
Fuentes de variación							
Trat	168,47 **	134**	72,27**	0,39 NS	0,60 NS	0,32 NS	178**
Error	4,30	0,013	3,93	0,23	1,85	0,12	6,75
GI trat	2	2	2	2	2	2	2
GI error	8	8	8	8	8	8	8
Coeficiente de variación	7,17	6,30	8,91	36,49	21,94	47,07	13

*diferencia significativa para $p<0,05$. $n=10$.**diferencias altamente significativas para $p<0,001$. $n=10$.

Se ha evidenciado que el volumen del frasco y el medio de cultivo líquido están relacionados con el número de los explantes como factores determinantes en la micropagación en biorreactores de inmersión temporal (Watt 2012). Con los tratamientos evaluados se determinó que a mayor volumen por explante mayor es la respuesta en el número de brotes durante la micropagación de *Vanilla planifolia*. Los resultados obtenidos se ajustaron a una ecuación de regresión que establece que por cada 10 ml de medio de cultivo que se aumente en el BIT® se incrementa un promedio de 5,3 brotes, 3,8 hojas y 5,21 gramos de peso fresco con un R^2 de 0,75 – 0,076 – 0,65 respectivamente. La longitud del brote disminuyó en 0,16 cm con un R^2 de 0,65 según el análisis de regresión realizado.

Estudio de comparación de la micropagación de *Vanilla planifolia* en un sistema de inmersión temporal y un medio semisólido. El estudio de respuesta de explantes en la micropagación de *V. planifolia* por medio de la prueba de contrastes de medias (*t de student*), mostró diferencias altamente significativas para las variables número de brotes, número de hojas e incremento de peso fresco al comparar el sistema de inmersión líquido (BIT) con el de medio semisólido durante 6 semanas. De esta manera se comprobó que el sistema de inmersión temporal influyó significativamente en la formación de brotes y superó en 16 el número de brotes al sistema de cultivo en medio semisólido. Resultados similares obtuvieron Bello-Bello *et al.* (2014) y

Ramírez-Mosqueda e Iglesias-Andreu (2016) al evidenciar que el cultivo de vainilla en Biorreactores resultó ser más eficiente, ya que generó 12 brotes por explante en promedio, mientras que la vainilla micropagada en el cultivo en medio semisólido solo produjo una tasa de multiplicación de 7 brotes por explante.

Los brotes formados en un sistema de inmersión temporal, tuvieron mayor superficie de contacto con el medio de cultivo líquido este sistema de cultivo permitió combinar la aeración con el burbujeo de la inmersión, ya que tomó del medio de cultivo los nutrientes y reguladores de crecimiento de forma más eficiente (Ramos-Castellá *et al.* 2014).

El número de hojas fue superior en BIT® con un promedio de 26 hojas mientras que en el sistema de cultivo semisólido se determinaron 15 hojas. Además, se comprobó la influencia del sistema líquido para la variable incremento de peso fresco, ya que con un valor de 26 g incrementó en peso fresco obtenido con el BIT® y superó los 6 g que se obtuvieron en el sistema semisólido (Figura 1 B). Se ha demostrado que especies micropagadas en el sistema BIT® producen mayor cantidad de brotes/explante cuando se comparan con el número de brotes/explante obtenidos en medios de cultivos semisólidos (Escalona *et al.* 2006). En el caso del cultivo de la vainilla, se obtuvo mayor cantidad de brotes en sistemas de inmersión temporal tipo RITA® al compararlo con los brotes/explante obtenidos en medios semisólidos (Bello-Bello *et al.* 2014).

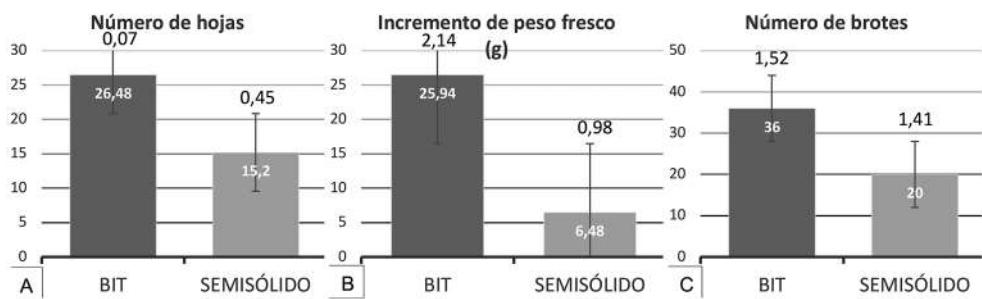


Figura 1. Efecto comparativo de los sistemas BIT y el medio semisólido. (a) número de hojas (b) incremento en peso fresco (c) número de brotes en *V. planifolia*, 6 semanas después de iniciada la siembra.

Respuestas morfogénicas de *Vanilla planifolia* y observaciones histológicas obtenidas en los BIT. Las respuestas morfogénicas observadas en este estudio incluyeron el estímulo de

brotes preformados, el estímulo de brotes adventicios con la formación de “cluster” y la transformación del meristemo radical en meristemos vegetativos (Figura 2).

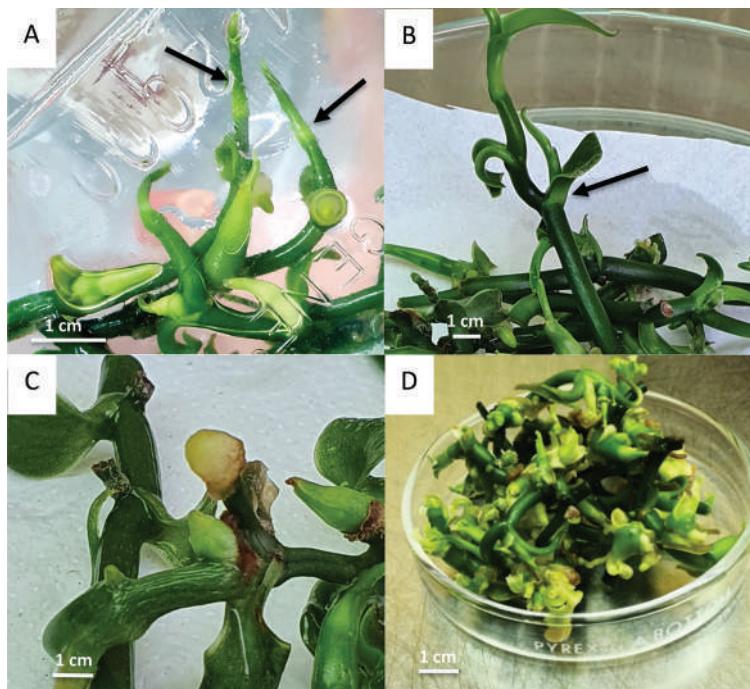


Figura 2. Morfología de estructuras regeneradas a partir de explantes de *V. planifolia* en BIT con tiempo de inmersión de 15 min, frecuencia de inmersión de 6 horas y volumen de medio de 40 ml/explante. (a) Estímulo del brote apical señalado con las flechas. (b) Estímulo de brotes axilares y formación de las raíces antes de su transformación en meristemos del brote. (c) Transformación de meristemos de raíz en meristemos vegetativos a partir de una masa de tejido meristemático (d) Estímulo de brotes adventicios que inician la formación de “cluster” y se demuestra la cantidad de brotes y biomasa alcanzada.

En los brotes de vainilla que produjeron raíces se evidenció la transformación del meristemo radical a meristemos vegetativos a través de la ruta organogénica directa detectada mediante la histología. En esta investigación, no se observaron estructuras que mostraran una ruta bipolar.

El sistema BIT® favoreció la formación de estructuras denominadas “cluster” cuyo análisis histológico mostró una ruta organogénica (Figura 3) u organogénesis de *novo* según

Sugiyama (1999), en un proceso de desdiferenciación de células y su reorganización en la división celular, con la formación de primordios y meristemos de órganos específicos. Los brotes y raíces de las plantas conservaron las funciones meristemáticas, aun si se eliminara parte o todos sus meristemos de la raíz o del tallo; además, las células vegetales de tejidos u órganos diferenciados tienen la capacidad de producir nuevos brotes y raíces laterales a través de la organogénesis (Zhang *et al.* 2018, Ikeuchi *et al.* 2016).

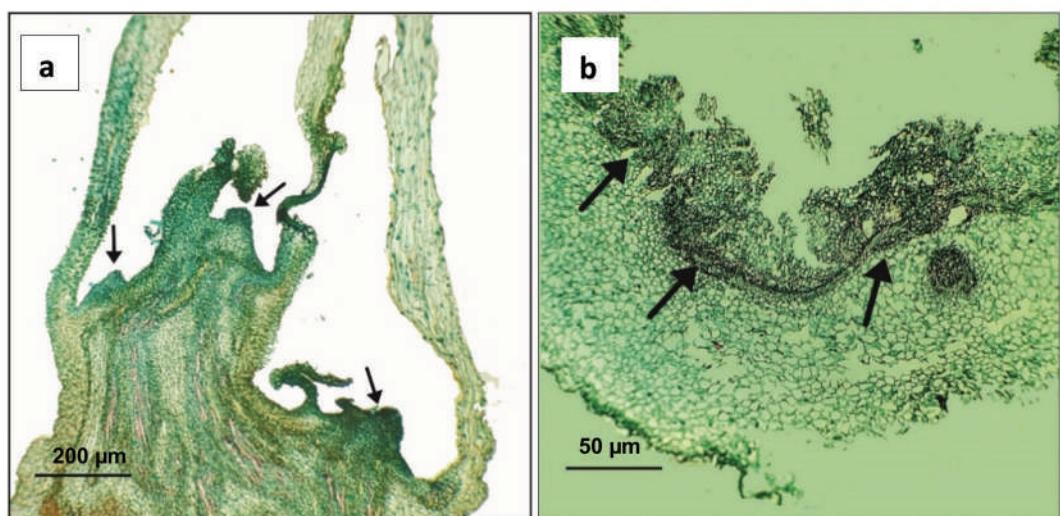


Figura 3. Análisis histológico de rutas morfogénicas en *V. planifolia* como respuesta a sistemas de cultivo BIT con tiempo de inmersión de 15 min, frecuencia de inmersión de 6 horas y volumen de medio de 40 ml/explant. (a) Formación de estructuras organogénsis que conducen a la formación de “un cluster”, (b) Grupo de células meristemáticas organizadas y diferenciación de múltiples estructuras a partir de meristemoides localizado en la parte distal de la raíz 6 semanas después de la siembra en un BIT®.

Las rutas morfogénicas de *V. planifolia* observadas en los BIT®, se desarrollaron en medio de cultivo que se suplementó con BA como citocinina en una concentración de 1mg.L^{-1} y la biomasa cuantificada como incremento en peso fresco y formación de brotes en presencia de BA en el medio de cultivo que presume ser uno de los factores determinantes en la formación de brotes preformados, y en el estímulo de brotes adventicios en *V. planifolia*. El estudio de Alatorre

(2002) evidenció que la presencia de BA en el medio de cultivo, interviene en la organogénesis in vitro de Vainilla tanto en brotes axilares como en terminales de raíz.

Respecto a la morfología de estructuras regeneradas a partir de explantes de *V. planifolia* en BIT® como respuesta al tiempo de inmersión, frecuencia de inmersión y volumen de medio de cultivo se evidenció que se siguieron la ruta de

organogénesis directa, que estimuló la formación de brotes preformados y de brotes adventicios tanto a partir de yemas axilares como de las terminales de raíz. Por su parte, la ruta organogénica en los explantes sembrados, inició con el desarrollo del brote apical y posteriormente con el de los brotes axilares. Las raíces formadas presentaron engrosamientos en el meristemo a través de una transformación de los meristemos radicales en meristemos vegetativos visibles una semana después de la siembra. Otra respuesta organogénica observada en los explantes de vainilla fue la formación de brotes adventicios organizados que se conformaron en “cluster” (Figura 2).

El análisis histológico de las estructuras obtenidas, evidenciaron a través del vínculo de bandas procambiales, a la ruta organogénica como la respuesta de los explantes de *V. planifolia* en los BIT empleado para su micropagación (Figura 3).

En la misma figura se observa el corte longitudinal de la terminal de la raíz engrosada presentó diferenciación de múltiples brotes a partir de meristemoídes formados en la parte distal del extremo de la raíz presente. Estos resultados coinciden con el estudio realizado por Philip y Nainar (1988) en medios semisólidos, quienes señalaron que las respuestas de transformación de meristemos radicales a meristemos vegetativos en *V. planifolia*, solo se manifiesta en raíces nuevas en interacción del corte realizado y la interacción con auxinas endógenas, al centro de quiescencia a la formación de brotes y raíces en estas terminales de raíces.

Asimismo se constató que la ruta morfológica directa obtenida, garantiza la estabilidad genética esperable del material micropagado, ya que reportó altos niveles de variación somaclonal durante la regeneración de callos en *V. planifolia* (Divakaran *et al.* 2015, Ramírez-Mosqueda e Iglesias-Andreu 2016), que es útil cuando se requiera promover la diversidad genética en *V. planifolia*, sin embargo, no es recomendable cuando se necesite material genético con motivos comerciales. Otro aspecto es que los subcultivos

analizados en laboratorio mostraron afectación en su estabilidad genética, pues se evidenció que los 6 a 10 subcultivos de vainilla in vitro con un medio suplementado con 8,86 µM BAP, mostraron variación genética (Pastelín Solano *et al.* 2019).

Por medio de la investigación se observó que la transformación de los meristemos de raíz en meristemos vegetativos; ocurrió en presencia de benciladenina y caseína hidrolizada en un medio de inmersión temporal muy similar a lo descrito por Philip y Nainar (1988). Además, el uso de benciladenina en el medio de cultivo para la transformación del meristemo radical en vegetativo coincidió con los resultados obtenidos por Alatorre (2002), quién señaló efectos de la benciladenina sobre la velocidad de desintegración de la caliptra y formación de estructuras vegetativas en las terminales de raíz.

Se evidenció la eficiencia de los BIT® en la micropagación de *V. planifolia* y se estableció la ruta organogénica directa con la formación de brotes preformados y brotes adventicios, lo cual lo que garantiza su estabilidad genética (Divakaran *et al.* 2015, Ramírez y Iglesias 2015), además la eficiencia mostrada con los BIT comparado con el medio de cultivo en medio semisólido ofrece una nueva opción para la micropagación de esta orquídea a gran escala.

Finalmente se reporta que esta investigación, es el primer informe de organogénesis de *Vanilla planifolia* evidenciado mediante histología y obtenida en este estudio de BIT® con un tiempo de inmersión de 15 min, frecuencia de inmersión de 6 horas y volumen de medio de 40 ml/explante, que ha presentado diferencias significativas en número de brotes, número de hojas e incremento de peso fresco en comparación con el medio semisólido.

AGRADECIMIENTO

A la Escuela Técnica Agrícola e Industrial (ETAI), al Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR) y a todas las personas que de forma directa o indirecta apoyaron este estudio.

LITERATURA CITADA

- Abdullah, WMAN; Low, LY; Mumaiyizah, SB; Chai, QY; Loh, JY; OngAbdullah, J; Lai, KS. 2020. Effect of lignosulphonates on *Vanilla planifolia* shoot multiplication, regeneration and metabolism. *Acta Physiologiae Plantarum* 42(107):107. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11738-020-03099-9>
- Abebe, ZA; Mengesha, A; Teressa, W; Tefera, W. 2009. Efficient in vitro multiplication protocol for *Vanilla planifolia* using nodal explants in Ethiopia. *African J. Biotechnol.* 8:6817-6821.
- Adame, J; Rodríguez, GR; Iglesias, ALG; Ramos, PM; Luna, RM. 2015. Molecular identification and pathogenic variation of *Fusarium* species isolated from in Papantla Mexico. *Botanical Sciences* 93(3):669-678. DOI: <http://dx.doi.org/10.17129/botsci.142>.
- Alatorre, CF. 2002. Estudio morfogénico e histológico del híbrido *Vanilla planifolia Andrews x Vanilla pompona* Schiede obtenido in vitro. Tesis Ingeniero Agrónomo. Chapingo, México. 92 p.
- Azofeifa-Bolanos, JB; Paniagua-Vásquez, A; García-García, JA. 2014. Importancia y desafíos de la conservación de *Vanilla* spp. (Orchidaceae) en Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana* 25(1):189-202.
- Azofeifa-Bolaños, JB; Rivera-Coto, G; Paniagua-Vásquez, A; Cordero-Solórzano, R; Salas-Alvarado, E. 2019. Efecto de la desinfección de segmentos nódulos sobre el rendimiento morfogenético de viveros de *Vanilla planifolia* Andrews. *Agronomía Mesoamericana* 30(1):33-49.
- Basail Pérez, M; Medero Vega, V; Otero Gálvez, E; Torres Delgado, M; López Torres, J; Cabrera Jova, M; Santos Pino, A; Rayas Cabrera, A; Bauta Toledo, M; Beovidez García, Y. 2012. Empleo de Sistemas de Inmersión Temporal como alternativa para la propagación in vitro del cultivar de plátano vianda INIVITPV06-30 (Musa AAB). *Biotecnología Vegetal* 12(1).
- Bello-Bello, J; Spinoso-Castillo, J; Iglesias-Andreu, L. 2014. Establecimiento de un sistema de biorreactores para la micropagación de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks ex Andrews). *Agroproductividad* 7(3):63.
- Bory, S; Lubinsky, P; Risterucci, AM; Noyer, JL; Grisoni, M; Duval, MF; Besse, P. 2008. Patterns of introduction and diversification of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae) in Reunion Island (Indian Ocean). *Am. J. Bot.* 95(7):805-815. DOI: <https://doi.org/10.3732/ajb.2007332>.
- Damian, A; Mitidieri, N. 2020. Living in the clouds: A new high-elevation species of *Vanilla* (Orchidaceae, Vanilloideae) from Perú. *Phytotaxa* 451(2):154-160. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.451.2.5>
- Divakaran, M; Babu, KN; Ravindran, PN; Peter, KV. 2015. Biotechnology for micropagation and enhancing variations in *Vanilla*. *Asian J. Plant Sci Res.* 5(2):52-62.
- Escalona, M; Gonzalez, J; Cejas, I; Aragon, C; Capote, I; Rodriguez, R; Cañal, M; Sandoval, J; Roels, S; Debergh, P. 2006. Temporary immersion bioreactor: An efficient technology for scalingup plant production. In vitro Cellular & Developmental Biology - Animal 42:13A-13A.
- Escalona, M; Lorenzo, JC; González, B; Daquinta, M; González, JL; Desjardins, Y; Borroto, CG. 1999. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Rep.* 18:743-748.
- Etienne, H; Berthouly, M. 2002. Temporary immersion systems in plant micropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69(3):215-231.
- Gantait, S; Mandal, N; Bhattacharyya, S; Das, PK; Nandy, S. 2009. Mass multiplication of *Vanilla planifolia* with pure genetic identity confirmed by ISSR. *Int. J. Plant Dev. Biol.* 3(1):18-23.
- Gelski, J. 2019. Vanilla prices slowly drop as crop quality improves. *FoodBussinesNews*, USA, Solsland Publishing. sp.
- George, PS; Ravishankar, GA. 1997. In vitro multiplication of *Vanilla planifolia* using Bud explants. *Plant Cell Report* 16:490-494.
- Georgiev, V; Schumann, A; Pavlov, A; Bley, T. 2014. Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineering in life sciences* 14(6):607-621.
- González, L. 2003. Respuesta de tres explantes de vainilla (*Vanilla planifolia*) a diferentes frecuencias de inmersión temporal. Informe Práctica Especialidad. Cartago, Costa Rica, ITCR. P. 67. Consultado 15 abr. 2019. Disponible en <https://repositoriotec.tec.ac.cr/handle/2238/216>
- Granados, O. 2018. Vainilla a precio de oro. *El País*, Madrid, España . Consultado 20 jun. 2018. Disponible en https://elpais.com/economia/2018/06/13/actualidad/1528910475_550952.html
- Iglesias-Andreu, L. 2018. Selección de genotipos de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews Resistentes a *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*, mediante biotecnología. *Agro Productividad* 11(3):70-74.
- Ikeuchi, M; Ogawa, Y; Iwase, A; Sugimoto, K. 2016. Plant regeneration: Cellular origins and molecular mechanisms. *Development* 143:1442-1451.
- Janarthanam, B; Seshadri, S. 2008. Plantlet regeneration from leaf derived callus of *Vanilla planifolia* Andr. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant 44(2):84-89.
- Mcalister, B; Finnie, J; Watt, MP; Blake, W; FC. 2005. Use of temporary immersion bioreactor system (RITA) for the production of commercial *Eucalyptus* clones at Mondi Forests (SA). *Plant Cell. Tissue. Organ Cult.* 81:347-358.

- Murashige, T; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* 15(3):473-497.
- Paek, KY; Chakrabarty, D; Hahn, E. 2005. Application of bioreactor systems for large production of horticultural and medicinal plants. *Plant Cell. Tissue. Organ Cult.* 81:287-300.
- Paek, Ky; Hahn, EJ; Son, SH. 2001. Application of Bioreactors for large-Scale Micropropagation Systems of Plants. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 37:149-157.
- Palama, TL; Menard, P; Fock, I; Choi, YH; Bourdon, E; Govinden-Soulange, J; Kodja, H. 2010. Shoot differentiation from protocorm callus cultures of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae): proteomic and metabolic responses at early stage. *BMC Plant Biology* 10(1):1-18.
- Palma, T. 2013. Micropropagación de cultivos tropicales de importancia económica. Centro de Investigación en Biotecnología, Agroindustria y Veterinaria. San Carlos, Costa Rica, Escuela Técnica Agrícola e Industrial (ETAI). 79 p.
- Pastelín Solano, MC; Salinas Ruiz, J; González Arnao, MT; Castañeda Castro, O; Galindo Tovar, ME; Bello Bello, JJ. 2019. Evaluation of in vitro shoot multiplication and ISSR marker based assessment of somaclonal variants at different subcultures of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks). *Physiology and Molecular Biology of Plants* 25(2):561-567. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12298-019-00645-9>.
- Philip, VJ; Nainar, S. 1986. Clonal propagation of *Vanilla planifolia* (Salisb.) Ames using tissue culture. *Journal of Plant Physiology* 122(3):211-215. DOI: [10.1016/S0031-9887\(86\)80119-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9887(86)80119-5).
- Philip, VY; Nainar, S. 1988. Transformación in vitro del meristemo de la raíz en brotes y plántulas en *Vanilla planifolia*. *Annals of Botany* 61:193-199. DOI: [10.1093/oxfordjournals.aob.a087542](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a087542).
- Ramírez, M; Iglesias, L. 2015. Indirect organogenesis and assessment of somaclonal variation in plantlets of *Vanilla planifolia* Jacks. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 123(3):657-664. DOI: [10.1007/s11240-015-0868-2](https://doi.org/10.1007/s11240-015-0868-2).
- Ramírez-Mosqueda, M; Iglesias Andreu, L. 2016. Evaluation of different temporary immersion systems (BIT®, BIG, and RITA®) in the micropropagation of *Vanilla planifolia* Jacks. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 52:154-160. DOI: [10.1007/s11627-015-9735-4](https://doi.org/10.1007/s11627-015-9735-4).
- Ramos-Castellá, A; Iglesias-Andreu, LG; Bello-Bello, J; Lee-Espinosa, H. 2014. Improved propagation of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 50(5):576-581.
- Shaik, S; Dewir, YH; Singh, N; Nicholas, A. 2010. Micropropagation and bioreactor studies of the medicinally important plant *Lessertia (Sutherlandia) frutescens* L. *South Afr. J. Bot.* 76:180-186.
- Soto, M; Dressler, R. 2010. A revision of the Mexican and Central American species of *Vanilla* Plumier ex Miller with a characterization of their ITS region of the nuclear ribosomal DNA. *Lankesteriana*. 9:285-354. DOI: [10.15517/lank.v0i0.12065](https://doi.org/10.15517/lank.v0i0.12065).
- Spinoso-Castillo, JL; Chavez-Santoscoy, RA; Bogdanchikova, N. 2017. Antimicrobial and hormetic effects of silver nanoparticles on in vitro regeneration of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue Organ Culture* 129:195-207. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1169-8>.
- Sreedhar, RV; Venkatachalam, L; Neelwarne, B. 2009. Hyperhydricity-Related Morphologic and Biochemical Changes in Vanilla (*Vanilla planifolia*). *J. Plant Growth Regulation* 28:46-57. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00344-008-9073-4>.
- Sugiyama, M. 1999. Organogenesis in vitro. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2:61-64.
- Tan, BC; Chin, CF; Alderson, P. 2013. Effects of sodium nitroprusside on shoot multiplication and regeneration of *Vanilla planifolia* Andrews. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 49(5):626-630.
- Watt, MP. 2012. The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. *African Journal of Biotechnology* 11:14025-14035. DOI: [10.5897/AJB12.1693](https://doi.org/10.5897/AJB12.1693).
- Yeh, CH; Chen, KY; Lee, YI. 2021. Asymbiotic germination of *Vanilla planifolia* in relation to the timing of seed collection and seed pretreatments. *Botanical Studies* 62:6. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40529-021-00311-y>.
- Zhang, H; Zhang, TT; Liu, H; Shi, DY; Wang, M; Bie, XM; Li, XG; Zhang, XS. 2018. Thioredoxin mediated ROS homeostasis explains natural variation in plant regeneration. *Plant Physiol.* 176:2231-22



Todos los derechos reservados. Universidad de Costa Rica. Este artículo se encuentra licenciado con Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Costa Rica. Para mayor información escribir a rac.cia@ucr.ac.cr

DIAGNÓSTICO FOLIAR DE NUTRIMENTOS DE NUEVE ESPECIES FORESTALES TROPICALES DE TRES PISOS ALTITUDINALES EN CENTRO AMÉRICA

Alfredo Alvarado-Hernández^{1/*}, Ronald Chaves-Corea², Eduardo Chacón-Madrigal³, Wilberth Rodríguez-Alfaro⁴, Freddy Blanco-Montero⁵

Palabras clave: Concentración foliar; N-P-K-Ca-Mg-S-Fe-Mn-Zn-B-Cu-Al-Na; *Alnus acuminata*; *Cedrela odorata*; *Cordia alliodora*; *Gmelina arborea*; *Tectona grandis*; *Terminalia amazonia*; *Vochysia guatemalensis*; *Vochysia ferruginea* y *Pachira quinata*; Centroamérica.

Keywords: Foliar concentration; N-P-K-Ca-Mg-S-Fe-Mn-Zn-B-Cu-Al-Na; *Alnus acuminata*; *Cedrela odorata*; *Cordia alliodora*; *Gmelina arborea*; *Tectona grandis*; *Terminalia amazonia*; *Vochysia guatemalensis*; *Vochysia ferruginea*; *Pachira quinata*; Central America.

Recibido: 27/07/2021

Aceptado: 01/09/2021

RESUMEN

Introducción. Es poca la información sobre concentración foliar de nutrientes en especies forestales en Centro América. Se hace necesario desarrollar conocimiento que permita manejar de manera satisfactoria la nutrición de estos cultivos. **Objetivo.** Definir los niveles “normales” de concentración foliar al eliminar los valores atípicos fuera del rango de variación con un valor central entre el primer y tercer cuartil en histogramas de distribución de frecuencias de especies forestales. **Materiales y métodos.** Con material foliar de especies forestales de Costa Rica, Panamá, Guatemala, México y Colombia se confeccionó una base de datos con 3566 entradas con la que se preparó otra más pequeña para los análisis de las especies que se estudian en el presente documento, provenientes de 3 pisos

ABSTRACT

Foliar nutrient diagnosis of nine tropical forestry species from three altitudinal belts of Central America. Introduction. Foliar nutrient concentration in forestry species of Central America is scarce. There is need to develop data to help in satisfactory handle nutrition of these crops. **Objetive.** To define “normal” foliar levels of nutrients considered as those that after eliminating atypical values in a histogram remain in the first and third quartiles of a normal frequency distribution of data available. **Materials and methods.** Foliar samples of forestry species collected in Costa Rica, Panamá, Guatemala, México and Colombia were analyzed and data were used to conform a data base with 3566 entries, a subset of data was prepared to generate the information

* Autor para correspondencia. Correo electrónico: alfredo.alvarado@ucr.ac.cr

1 Universidad de Costa Rica, Centro de Investigaciones Agronómicas, Facultad de Agronomía, San José, Costa Rica.

 0000-0002-6930-6660.

2 Universidad de Costa Rica, Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, San José, Costa Rica.

 0000-0002-5003-0502.

3 Universidad de Costa Rica, Centro de Investigaciones Agronómicas, Facultad de Agronomía, San José, Costa Rica.

 00000-0002-8328-5456.

4 Universidad de Costa Rica, Centro de Investigaciones Agronómicas, Facultad de Agronomía, San José, Costa Rica.

 00000-0003-4516-8360.

5 Universidad de Costa Rica, Centro de Investigaciones Agronómicas, Facultad de Agronomía, San José, Costa Rica.

 00000-0002-6733-449X.

altitudinales. Se calculó la mediana de valores de nutriente para toda la población como base para determinar las desviaciones estándar y sus valores normales de concentración de N-P-K-Ca-Mg-S-Fe-Mn-Zn-B-Cu-Al-Na. **Resultados.** Los resultados fueron una primera aproximación sobre la concentración foliar porcentual total en función del crecimiento de 9 especies forestales en los pisos altitudinales Tropical Húmedo-Muy Húmedo (4,23-6,77%), Tropical Estacionalmente Seco (4,65-6,05%) y Premontano (5,83-9,36%). Son significativamente afectados por el piso altitudinal la concentración de Al en los pisos Tropical Húmedo-Muy Húmedo y el N en el Tropical Estacionalmente Seco. La distribución en porcentaje de las principales especies forestales estudiadas fue *C. alliodora* (9,36), *V. guatemalensis* (6,77), *C. odorata* (6,58), *G. arborea* (6,05), *P. quinata* (5,91), *A. acuminata* (5,83), *V. ferruginea* (4,81), *T. grandis* (4,65) y *T. amazonia* (4,23). **Conclusiones.** En los pisos Tropical Húmedo-Muy Húmedo la presencia de *V. guatemalensis* y *V. ferruginea* mostró elevados valores en mg.L⁻¹ de Al (13 470-22 172)>B(112-130)>Na(401) y porcentuales de P(0,54-0,68). La especie *T. amazonia* presenta concentraciones porcentuales altas de P(0,59)>B(164)>Cu(46) en mg.L⁻¹. En el bosque Tropical Estacionalmente Seco ninguna de las especies estudiadas (*G. arborea*, *T. grandis* y *P. quinata*) presentó concentraciones elevadas de ningún elemento de los estudiados. En el piso Premontano se encontró valores porcentuales elevados de N(3,57)>K(1,13) en *A. acuminata*, en *C. alliodora* de N(3,45)>Ca(3,29)>K(1,24)>Mg(1,02) y en *C. odorata* de N(3,22).

for the 9 species considered in the present document obtained from 3 altitudinal belts. Analyses performed included N-P-K-Ca-Mg-S-Fe-Mn-Zn-B-Cu-Al-Na. **Results.** Information presented is the first approximation about foliar total concentration of nutrients of nine forestry species in Central America growing in the Tropical Humid-Very Humid (4.23-6.77%), Tropical Seasonally Dry (4.65-6.05%) and Premontane (5.83-9.36%) altitudinal belts. Foliar concentrations of Al in the Tropical Humid-Very Humid and N in the Tropical Seasonally Dry were particularly large. The percentage of main forestry species analyzed was distributed as *C. alliodora* (9.36), *V. guatemalensis* (6.77), *C. odorata* (6.58), *G. arborea* (6.05), *P. quinata* (5.91), *A. acuminata* (5.83), *V. ferruginea* (4.81), *T. grandis* (4.65) and *T. amazonia* (4.23). **Conclusions.** The presence of *V. guatemalensis* and *V. ferruginea* in the Tropical Humid-Very Humid belts affected foliar concentrations to high values (mg.L⁻¹) of Al (13 470-22 172)>B(112-130)>Na(401)>P(0.54-0.68%) and that of *T. amazonia* the concentrations of P(0.59%), B(164 mg.L⁻¹), and Cu(46 mg.L⁻¹). In the Tropical Seasonally Dry Tropical Forest none of the species studied (*G. arborea*, *T. grandis* and *P. quinata*) showed high foliar concentrations of any element. Foliar values found for N(3.57)>K(1.13) in *A. acuminata*, of N(3.45)>Ca(3.29)>K(1.24)>Mg(1.02) in *C. alliodora*, and of N(3.22) in *C. odorata* in the Premontane belt were considered as high.

INTRODUCCIÓN

Uno de los principales problemas asociados al manejo de la nutrición de bosques y plantaciones forestales en regiones tropicales consiste en encontrar métodos de diagnóstico que faciliten

determinar cuáles son los factores nutricionales que en mayor medida limitan su productividad (Alvarado y Raigosa 2012). Según Lavender (1970), aunque el inicio del análisis químico de las plantas en 1804 se atribuye a Sausure al demostrar que el contenido de cenizas en los órganos de las

plantas varía entre especies, su edad, órgano a analizar y el suelo sobre el que crecen, no es sino hasta en 1905 cuando Hall sugiere la utilización de esta práctica como guía para la toma de decisiones en la fertilización de cultivos.

Veinte años después se inicia la investigación para establecer estándares de comparación mejorando las tecnologías de análisis para estudiar el contenido de nutrientes y se conforman 2 grupos de investigadores, los que preferían el análisis de muestras secas o el de material fresco para evitar pérdidas de algunos elementos por volatilización. El mismo Lavender (1970) cita que de las primeras décadas del siglo XX se conocen pocos estudios sobre el análisis de plantas, mencionando como sobresalientes los de Mitchell (1934) y Leyton (1948) como pioneros en la identificación de contenidos foliares y hasta de mantillo del suelo para establecer niveles de deficiencias, críticos y de consumo de lujo para algunas especies de coníferas de zonas templadas.

Aunque hoy en día el análisis foliar es un método de diagnóstico de requerimientos nutricionales bien establecido en agricultura y horticultura, su empleo es menos frecuente en el sector forestal donde se considera debe emplearse en combinación con otros procedimientos que permitan identificar el porqué de los niveles de insuficiencia y la manera de remediar el problema nutricional (Driessche 1974). Entre los métodos disponibles, el análisis de tejidos vegetales tiene relevancia al considerar en su empleo aspectos como los procedimientos de extracción de nutrientes en el laboratorio, la definición del órgano (tejido) a analizar y la escogencia de los árboles a muestrear (Smith y Loneragan 1997).

El análisis foliar es un instrumento que permite determinar la concentración total de los nutrientes en las acículas y hojas de los árboles de manera rápida y así comparar los valores obtenidos en diferentes partes del mundo por muchos investigadores (Binkley 1986, Drechsel y Zech 1991). Evans (1979) y Smith y Loneragan (1997) consideran que a pesar de las variaciones de la concentración foliar encontradas entre especies,

es con esta información que se trata de establecer el estado nutricional de las plantaciones, para diagnosticar y predecir posibles trastornos de nutrientes que se cuantifican para reponer los extraídos, en este caso por explotación de la madera. Varios autores (Drechsel y Zech 1993, Lugo *et al.* 2012, Alvarado 2015) mencionaron que los valores de concentración de los nutrientes en el tejido foliar varían principalmente en función de la especie, las condiciones de sitio (p.e. la variación altitudinal), el manejo silvicultural y en menor grado por la edad de los sistemas forestales, la variación introducida durante el muestreo de los tejidos y la relacionada con el proceso de análisis a nivel de laboratorio (Corrales *et al.* 2005).

El efecto del componente genético es decir la especie, subespecie, variedad, procedencia, genotipo, clon o híbrido (Ballard 1984, Boardman y McGuire 1990, Drechsel y Zech 1991, Lehto *et al.* 2010) es muy utilizado en proyectos de mejoramiento genético donde se han observado diferencias en la concentración de ciertos elementos para distintas etapas de crecimiento, clase diamétrica (edad del árbol), desarrollo y posición del tejido foliar en la copa del árbol, la distribución de la biomasa de raíces en el suelo, la posición de las hojas en la copa, la caída del follaje, la autopoda, el estado fenológico del árbol y la edad del follaje (hojas jóvenes, maduras o viejas). En bosques inundables de la Amazonía Brasileña se ha encontrado que las hojas viejas son más ricas en Ca y Mg que las hojas jóvenes, que a la vez son más ricas en K y a menudo en N, P y Na. Además, los contenidos foliares de las especies son más elevados en ecosistemas con suelos y ríos a su alrededor altos en Ca, Mg y Na (Klinge *et al.* 1983, Klinge 1985).

Desde el punto de vista altitudinal las especies comparadas del piso Premontano presentan las mayores concentraciones foliares acompañadas de una capacidad de absorción reducida, aspectos relevantes en proyectos de reforestación para conservar y mejorar el ambiente. Pregitzer y King (2005) indican que desde el punto de vista nutricional la capacidad

de absorción de nutrientes, decrece con la altura del sitio debido a (i) la reducción de la tasa de fotosíntesis causada por un aumento de la nubosidad y la baja radiación solar, (ii) la disminución de la temperatura y menores tasas de respiración y transpiración a mayor elevación y (iii) una menor disponibilidad de nutrientes causada por la baja temperatura y bajos valores de pH que reducen la tasa de mineralización de residuos. Tanner *et al.* (1998) mencionan que la baja tasa de crecimiento de la vegetación en el Bosque Tropical Montano se debe a la reducida disponibilidad de nutrientes y que a mayor altitud el contenido foliar de N disminuye, los de P y K a menudo disminuyen y los de Ca y Mg no presentan ninguna tendencia definida. Sin embargo, la información disponible sobre una reducción del contenido foliar de P en la montaña alta no es concluyente y más bien confirma la evidencia de bajos niveles de N (Kitayama y Aiba 2002, Soethe *et al.* 2008).

Por medio del análisis foliar se han identificado especies arbóreas y leñosas hipertolerantes o hiperacumuladoras de metales pesados (Baker y Brooks 1989, van der Ent *et al.* 2013, Leitenmaier y Küpper 2013), de importancia en proyectos de fitoremediación y como fitominadoras (Rascio y Navari-Izzo 2011). La definición de plantas hiperacumuladoras de uno o varios elementos se puede estudiar en los trabajos de varios autores quienes han descrito relaciones entre la disponibilidad de elementos en el suelo y los absorbidos por los árboles y especies o grupos de especies de plantas (Chernery y Sporke 1976, Haridasan 1982, Breulmann *et al.* 1996, Ma *et al.* 2005, Fernando *et al.* 2009).

Entre las condiciones de sitio que pueden afectar la concentración foliar de los nutrientes se incluyen la pendiente y la elevación del terreno, la temperatura del sitio, la pedregosidad, la condición de drenaje, la profundidad y la fertilidad del suelo, el reciclaje de los nutrientes, la variación y duración de la estacionalidad climática (diaria, anual e interanual) que define la época de muestreo (p.e. caída de follaje, floración, fructificación, etc.), la cantidad y distribución

de la lluvia que adiciona y lava nutrientes, la luminosidad y la frecuencia e intensidad de las quemas y la frecuencia de inundaciones (Alvarado 2015). Los factores mencionados a su vez influyen sobre el número de árboles a plantar por unidad de superficie, la variación natural entre los árboles individuales de la plantación, la poda, el raleo, el control de malezas, la sanidad del rodal, las quemas y la adición de enmiendas como fertilizantes y cal, la variación de producción de biomasa, la acumulación de nutrientes y la producción y reciclaje de residuos en bosques nativos y plantaciones forestales.

Por la relevancia ambiental y la socioeconómica en términos de ingreso de recursos a las familias y empresas, de mantenimiento de ecosistemas y la recuperación de tierras degradadas, en el presente trabajo se consideró estudiar la dinámica de nutrientes en el tejido foliar de especies de los pisos Tropical Estacionalmente Seco, Tropical Húmedo-Muy Húmedo y Premontano de Costa Rica, con 3 especies de cada piso altitudinal previamente descritas por Alvarado y Raigosa (2012). Se enfatiza en presentar la información existente sobre análisis foliares y su interpretación basándose en resultados obtenidos con muestras foliares de plantaciones y bosques naturales en Costa Rica, con la incorporación de otras de Colombia, Panamá, Guatemala y México según su disponibilidad. El principal punto de referencia para comparar los valores encontrados lo constituye el trabajo de Drechsel y Zech (1991) y a nivel centroamericano los de González (1996) y Alvarado *et al.* (1997).

MATERIALES Y MÉTODOS

La información utilizada en el presente trabajo proviene de estudios propios realizados en Costa Rica y Panamá y por otras personas autoras en Guatemala, México y Colombia para las especies *Alnus acuminata* (jaúl o aliso), *Cedrela odorata* (cedro amargo o spanish-cedar), *Cordia alliodora* (laurel), *Gmelina arborea* (melina, yemane o gamar), *Tectona grandis* (teca o teak), *Terminalia amazonia* (roble coral

o amarillón), *Vochysia guatemalensis* (cebo, mayo, chancho o yemeri), *Vochysia ferruginea* (botarrama, mayo colorado, chancho colorado) y *Pachira quinata* (pochote, ceiba roja o saqui-saqui). Basados en dicha información se confeccionó una base de datos con 3566 valores de concentración foliar, provenientes de 61 familias, 130 géneros y 203 especies.

Luego se calculó la mediana de valores para toda la población y nutrimiento como base para determinar las desviaciones estándar y con ellas los valores normales de concentración en un subgrupo de muestras mayor a 18 de cada una de las 9 especies comparadas con resultados de análisis foliares para N, P, K, Ca, Mg, S, Fe, Mn, Zn, B, Cu, Al y Na (Tabla 1).

Tabla 1. Características ambientales y concentración foliar porcentual de las especies comparadas durante la investigación.

Especie	Familia	n	Conc. Fol. (%)	Elev. Máx. (msnm)	Temp (°C)	Prec. Anual (mm)	Referencia
Bosque Premontano							
<i>Cordia alliodora</i>	Cordiaceae	42	9,36	1400	18-32	1300-2000	Cadena 1989, Bergmann <i>et al.</i> 1994
<i>Cedrela odorata</i>	Meliaceae	65	6,58	1000	24-30	2500-4000	Guevara 1988, Ramírez 2014, Pancel 2015
<i>Alnus acuminata</i>	Betulaceae	300	5,83	2600	12-20	1500-2500	Segura 2005
Bosque Húmedo-Muy Húmedo Tropical							
<i>Vochysia guatemalensis</i>	Vochysiaceae	60	6,77	1500	24-30	3000-5000	Camacho 2014
<i>Vochysia ferruginea</i>	Vochysiaceae	18	4,81	1500	24-30	3000-5000	Herrera 1996
<i>Terminalia amazonia</i>	Combretaceae	60	4,23	1200	21-28	200-3500	Montenegro 2005, Fernández-Moya y Alvarado 2012
Bosque Estacionalmente Seco Tropical							
<i>Gmelina arborea</i>	Lamiaceae	215	6,05	600	22-30	2000-4000	Murillo 1996, Avellán 2012
<i>Pachira quinata</i>	Malvaceae	93	5,91	900	20-27	800-3000	Caguasango 2012
<i>Tectona grandis</i>	Lamiaceae	372	4,65	800	22-30	2000-3500	Vaides 2004, Murillo <i>et al.</i> 2014, Fallas 2014

Las referencias citadas permitieron definir los valores de elevación máxima y promedios medios anuales de temperatura y precipitación considerados por los autores como adecuados para el crecimiento de las especies comparadas.

Metodología de muestreo. El tejido foliar analizado proviene de varios muestreos realizados durante la confección de trabajos de graduación de estudiantes de Licenciatura, Maestría y Doctorado en Costa Rica, Panamá, Guatemala, Colombia y México (p.e. Chaves-Corea 2021, Chacón-Madrigal *et al.* 2018). También incluye muestras tomadas en fincas y bosques del Trópico Húmedo, Muy Húmedo y Estacionalmente Seco por investigadores de la Universidad Nacional de Costa Rica en todo el país (Fonseca *et al.* 2016) durante 1999 y 2015. Las muestras provienen de sitios principalmente a menos de 2500 msnm con regímenes de temperatura isohiper térmicos y de humedad perúdico, údico y ústico. En los muestreos de siguió las normas descritas y recomendadas para cada especie previamente descritas por Alvarado *et al.* (1997).

Análisis de laboratorio. Las muestras de Costa Rica y Panamá se analizaron por P, Ca, Mg, K, S, Fe, Mn, Cu, Zn, B, Na y Al en los laboratorios de Suelos y Foliares del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica en un aparato de espectrometría de emisión modelo ICP OES Perkin Elmer Optima 8300 con la metodología descrita por Kalra (1998) y la concentración de N mediante combustión seca en un analizador Elementar Rapid N° 3. Las muestras de otros países se analizaron por

métodos similares descritos en los trabajos de los autores que permitieron su utilización.

Análisis de los datos. Se aplicó estadística descriptiva con los datos de la cantidad de individuos, medianas, desviaciones, errores estándar y rangos por elemento, asimismo, se calculó el valor intermedio por especie y por elemento. Para la estimación del rango de concentración foliar intermedio, se calculó el primer (25%) y tercer cuartil (75%) de cada elemento por especie, considerados como los valores mínimo y máximo del rango intermedio. Las especies forestales que se clasifican como acumuladoras de elementos son aquellas que poseen en la concentración foliar de uno o varios elementos y con las hiperacumuladoras se presentan de rojo en los Tablas 2, 3 y 4, medianas entre el percentil el 80% y el 95% de la población total. Aquellas especies en las que la mediana de la concentración foliar de uno o varios elementos se encuentra por arriba de la mediana global en más de 2 desviaciones estándar (mayor al percentil 95%) se clasifican como hiperacumuladoras. Todas las especies cuya concentración foliar de elementos se encuentren entre los percentiles 25 y 80 se consideran como especies generalistas. En todos los casos los valores de todos los elementos se presentan en tablas, ordenados por especie y por concentraciones de mayor a menor, según algunos niveles internacionales considerados altos para la mayoría de las especies.

Tabla 2. Contenido foliar de macronutrientos y microelementos de las especies *A. acuminata*, *C. alliodora* y *C. odorata* del bosque Tropical Premontano de Costa Rica.

Estadísticos	N	Ca	Mg %	K %	P	S	Na	Fe	Mn	Zn mg.L ⁻¹	B	Cu	Al
<i>Alnus acuminata</i> (presente estudio)													
n	300	299	300	296	300	300	16	299	298	300	299	298	31
Mediana	3,57	0,46	0,18	1,13	0,28	0,19	77	76	39	15	33	19	165
DE	0,65	0,15	0,04	0,21	0,06	0,05	42	65	23	7	9	6	191
Rango	3,60	0,66	0,25	1,17	0,42	0,32	135	433	137	56	51	35	530
EE	0,038	0,008	0,003	0,012	0,004	0,003	10,4	3,8	1,3	0,4	0,5	0,4	34,4
Q,0,25 – Q,0,75	9,3 - 3,9	0,4 - 0,6	0,2 - 0,3	1,0 - 1,3	0,2 - 0,3	0,1 - 0,2	66 - 107	66 - 88	29 - 51	12 - 19	29 - 39	17 - 22	16 - 385
<i>Alnus acuminata</i> (de la literatura)													
Ámbito total	1,9 - 4,4	0,2 - 1,4	0,1 - 0,4	0,2 - 2,5	0,1 - 0,5	0,1 - 0,2	nd	48 - 404	12 - 1014	19 - 80	20 - 50	10 - 59	nd
Nivel crítico	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Cordia alliodora</i> (presente estudio)													
n	42	42	42	42	42	42	6	42	42	42	42	42	6
Mediana	3,45	3,28	1,02	1,24	0,15	0,18	48	162	40	33	27	15	235
DE	0,37	0,67	0,13	0,23	0,02	0,06	31	72	18	10	6	5	118
Rango	1,51	2,93	0,51	1,0	0,08	0,29	88	316	74	45	20	22	272
EE	0,057	0,104	0,020	0,035	0,003	0,009	12,7	11,1	2,8	1,6	0,9	0,08	48,3
Q,0,25 – Q,0,75	3,1 - 3,7	2,8 - 3,6	0,9 - 1,1	1,0 - 1,3	0,1 - 0,2	0,2 - 0,3	36 - 63	122 - 193	32 - 60	26 - 38	23 - 33	13 - 18	99 - 289
<i>Cordia alliodora</i> (de la literatura)													
Ámbito total	1,6 - 3,3	0,1 - 2,6	0,1 - 1,4	0,4 - 2,6	0,1 - 0,7	0,2 - 0,3	nd	23 - 233	6 - 77	19 - 64	14 - 70	10 - 75	37 - 320
Nivel crítico	2,4	nd	nd	nd	0,15	nd	nd	nd	56	nd	nd	12	nd
<i>Cedrela odorata</i> (presente estudio)													
n	65	65	65	65	65	21	19	29	65	57	65	65	20
Mediana	3,22	2,10	0,18	0,58	0,24	0,24	47	106	33	33	34	6	57
DE	0,68	0,84	0,09	0,42	0,04	0,04	41	84	32	10	15	6	57
Rango	4,49	3,69	0,44	1,59	0,18	0,13	170	296	167	41	96	20	217
EE	0,084	0,104	0,011	0,053	0,005	0,008	9,4	15,5	40	1,3	1,9	0,7	12,8
Q,0,25 – Q,0,75	2,7 - 3,4	1,1 - 2,5	0,2 - 0,3	0,4 - 1,1	0,2 - 0,3	0,2 - 0,3	34 - 68	84 - 210	27 - 41	22 - 36	29 - 41	5 - 8	40 - 77
<i>Cedrela odorata</i> (de la literatura)													
Ámbito total	1,7 - 3,5	0,4 - 1,8	0,1 - 2,4	0,7 - 2,4	0,1 - 0,3	0,02 - 0,04	10 - 862	50 - 354	24 - 177	14 - 72	27 - 40	5 - 24	20 - 148
Nivel crítico	1,42	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	22	nd	nd	2	nd

Se presenta el tamaño de muestra (n), la mediana, la desviación estándar (DE), el rango, el error estándar (EE), el intervalo intercuartil (Q0,25-Q0,75), el ámbito de concentración y el nivel crítico obtenido como valor promedio reportados en la literatura.

Tabla 3. Contenido foliar de macronutrientos y microelementos de las especies *V. guatemalensis*, *V. ferruginea* y *T. amazonia* del bosque Tropical Húmedo y Muy Húmedo de Costa Rica.

Estadísticos	N	Ca	Mg	%	K	P	S	Na	Fe	Mn	Zn mg.L ⁻¹	B	Cu	Al
<i>Vochysia guatemalensis</i> (presente estudio)														
n	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
Mediana	2,37	0,10	0,94	0,34	0,54	0,21	401	90	6	14	112	26	22	172
DE	0,30	0,05	0,29	0,08	0,43	0,05	936	96	2	6	71	9	3718	
Rango	1,30	0,17	1,22	0,32	1,55	0,27	2336	605	8	37	446	41	15 604	
EE	0,039	0,006	0,037	0,010	0,056	0,006	120,8	124,	0,3	0,8	9,2	1,2	480,0	
Q,0,25 - Q,0,75	2,2 - 2,5	0,1 - 0,2	0,8 - 1,1	0,3 - 0,4	0,4 - 1,0	0,2 - 0,3	87 - 1432	62 - 165	5 - 8	12 - 17	77 - 150	20 - 32	19 099 - 24 928	
Ámbito total	1,2 - 3,2	0,6 - 1,6	0,2 - 0,5	0,3 - 1,5	0,1 - 0,2	0,1 - 0,2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	40000 - 29 000	
Nivel crítico	nd	nd	nd	nd	nd	nd								
<i>Vochysia ferruginea</i> (presente estudio)														
n	10	10	10	10	10	5	5	9	10	10	10	5	10	
Mediana	1,70	0,10	0,67	0,15	0,68	0,14	80	108	14	13	130	19	13 470	
DE	0,36	0,06	0,15	0,04	0,29	0,01	19	315	4	4	76	6	2721	
Rango	1,33	0,13	0,47	0,10	0,77	0,04	46	778	13	12	264	16	9018	
EE	0,114	0,018	0,046	0,011	0,091	0,007	8,3	104,8	1,3	1,2	24,1	2,7	860,5	
Q,0,25 - Q,0,75	1,6 - 1,9	0,2 - 0,3	0,6 - 0,8	0,1 - 0,2	0,5 - 1,0	0,1 - 0,2	62 - 85	102 - 128	10 - 15	10 - 16	89 - 173	17 - 21	12 608 - 14 349	
Ámbito total	1,1 - 2,0	0,5 - 1,2	0,1 - 0,3	0,2 - 0,5	0,1 - 0,2	0,1 - 0,2	5 - 80	50 - 400	40 - 500	2 - 30	10 - 40	4 - 25	11 000 - 19 000	
Nivel crítico	nd	nd	nd	nd	nd	nd								
<i>Terminalia amazonia</i> (presente estudio)														
n	53	52	54	53	54	55	49	53	55	55	52	55	50	
Mediana	1,71	0,10	1,48	0,23	0,59	0,12	76	80	10	18	164	46	61	
DE	0,21	0,05	0,40	0,06	0,19	0,02	54	48	3	10	104	17	40	
Rango	1,07	0,24	2,03	0,26	0,87	0,12	229	183	15	74	462	70	176	
EE	0,029	0,007	0,066	0,009	0,026	0,003	7,7	6,6	0,4	1,4	14,4	2,3	5,7	
Q,0,25 - Q,0,75	1,6 - 1,8	0,1 - 0,2	1,1 - 1,8	0,2 - 0,3	0,5 - 0,7	0,1 - 0,2	45 - 99	51 - 104	8 - 12	16 - 21	103 - 211	34 - 59	36 - 86	
Ámbito total	1,1 - 2,1	0,5 - 1,7	0,1 - 0,3	0,5 - 1,4	0,1 - 0,3	0,1 - 0,2	0 - 80	30 - 100	40 - 350	6 - 30	10 - 40	4 - 25	10 - 150	
Nivel crítico	1,05	nd	nd	0,09	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	

Se presenta el tamaño de muestra (n), la mediana, la desviación estándar (DE), el rango, el error estándar (EE), el intervalo intercuartil (Q0,25-Q0,75), el ámbito de concentración y el nivel crítico obtenido como valor promedio reportados en la literatura.

Tabla 4. Contenido foliar de macronutrientos y microelementos de las especies *G. arborea*, *T. grandis* y *P. quinata* del bosque Tropical Estacionalmente Seco de Costa Rica.

Estadísticos	N	Ca	Mg	K	P	S	Na	Fe	Mn	Zn	B	Cu	Al
	%									mg L ⁻¹			
<i>Gmelina arborea</i> (presente estudio)													
n	214	216	214	216	215	135	118	209	207	135	216	216	127
Mediana	2,58	1,62	0,40	1,04	0,23	0,15	38	64	52	39	58	9	27
DE	0,47	0,77	0,14	0,34	0,06	0,02	32	43	32	13	28	4	19
Rango	2,04	3,64	0,63	2,36	0,31	0,11	123	238	177	63	140	21	79
EE	0,032	0,052	0,009	0,023	0,004	0,002	2,9	3,0	2,2	1,1	1,9	0,3	1,7
Q 0,25 – Q 0,75	2,2 – 3,0	1,2 – 2,4	0,3 – 0,5	0,8 – 1,2	0,2 – 0,3	0,1 – 0,2	19 - 66	48 - 88	40 - 75	32 - 46	45 - 73	7 - 12	19 - 45
Ámbito total	1,8 – 3,9	0,5 – 3,2	0,2 – 0,9	0,4 – 1,6	0,1 – 0,3	0,1 – 0,2	nd	nd	24 – 255	16 – 105	10 - 64	4 - 19	10 - 183
Nivel crítico	2,5	0,3	nd	0,8	0,15	0,13	nd	nd	> 200	nd	nd	nd	nd
<i>Gmelina arborea</i> (de la literatura)													
n	371	372	371	366	369	312	207	372	372	351	369	299	
Mediana	1,98	1,25	0,35	0,76	0,14	0,15	20	56	45	26	10	31	
DE	0,50	0,76	0,37	0,43	0,06	0,04	41	93	37	13	10	5	28
Rango	2,85	3,74	1,77	1,78	0,36	0,18	257	774	322	87	65	32	182
EE	0,026	0,039	0,019	0,022	0,003	0,002	2,9	4,8	1,9	0,7	0,6	0,2	1,6
Q 0,25 – Q 0,75	1,7 – 3,2	0,8 – 1,8	0,3 – 0,6	0,4 – 1,1	0,1 – 0,2	0,1 – 0,2	13 - 44	44 - 84	32 - 65	20 - 35	22 - 31	8 - 13	21 – 42
Ámbito total	1,4 – 2,8	0,9 – 2,2	0,1 – 0,6	0,2 – 2,6	0,1 – 0,2	0,1 – 0,2	nd	nd	33 – 290	14 - 135	14 - 67	15 - 64	4 - 25
Nivel crítico	1,2	0,55	0,1	0,1	0,1	0,05	nd	nd	37	25	19	23	> 28
<i>Tectona grandis</i> (presente estudio)													
n	93	93	93	92	93	12	90	92	93	12	93	93	12
Mediana	2,45	1,81	0,73	0,84	0,26	0,16	73	87	24	30	15	8	47
DE	0,33	0,41	0,08	0,17	0,05	0,02	60	77	12	10	5	5	53
Rango	0,02	1,93	0,41	0,91	0,27	0,09	380	361	74	35	31	21	186
EE	0,034	0,042	0,009	0,018	0,006	0,007	6,4	8,1	1,2	2,9	0,5	0,6	15,4
Q 0,25 – Q 0,75	2,3 – 2,7	1,6 – 2,0	0,3 – 0,4	0,7 – 0,9	0,2 – 0,3	0,1 – 0,2	43 - 98	70 - 103	20 - 32	27 - 83	14 - 18	6 - 11	25 – 86
Ámbito total	2,2 – 2,8	0,8 – 2,7	0,3 – 0,5	0,7 – 1,5	0,2 – 0,3	nd	nd	70 - 263	14 - 78	14 - 21	nd	13 - 20	nd
Nivel crítico	nd	2,0	1,1	nd	0,26	nd	nd	nd	10	nd	nd	nd	nd
<i>Pachira quinata</i> (de la literatura)													
n	93	93	93	92	93	12	90	92	93	12	93	93	12
Mediana	2,45	1,81	0,73	0,84	0,26	0,16	73	87	24	30	15	8	47
DE	0,33	0,41	0,08	0,17	0,05	0,02	60	77	12	10	5	5	53
Rango	0,02	1,93	0,41	0,91	0,27	0,09	380	361	74	35	31	21	186
EE	0,034	0,042	0,009	0,018	0,006	0,007	6,4	8,1	1,2	2,9	0,5	0,6	15,4
Q 0,25 – Q 0,75	2,3 – 2,7	1,6 – 2,0	0,3 – 0,4	0,7 – 0,9	0,2 – 0,3	0,1 – 0,2	43 - 98	70 - 103	20 - 32	27 - 83	14 - 18	6 - 11	25 – 86

Se presenta el tamaño de muestra (n), la mediana, la desviación estándar (DE), el rango, el error estándar (EE), el intervalo intercuartil (Q0,25-Q0,75), el ámbito de concentración y el nivel crítico obtenido como valor promedio reportados en la literatura.

En general, se compararon los valores de concentración foliar de 9 especies recolectadas en el Trópico Americano para conocer su variación en función de la filogenia, ambiente de crecimiento y definir el rango de concentración normal de cada nutriente y para cada especie. Se identificaron también, los valores que se consideran como acumulados e hiperacumulados y al final de cada especie se introdujeron 2 filas con rangos totales y niveles críticos de concentración foliar mencionados en la literatura. Las letras “nd” infieren que no existe información al respecto al alcance del personal del trabajo y por tanto los valores del presente estudio fueron nuevos para la ciencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Variación del contenido foliar en los ecosistemas comparados

En la Tabla 1 se compara la concentración foliar porcentual (suma de todas las concentraciones porcentuales de los elementos analizados para cada especie) en función de los sitios estudiados. Este indicador muestra cómo los valores son propios para cada especie y sus rangos de variación por sitio son mayores en el piso Premontano (5,83-9,36%) y menores pero similares entre sí en los pisos Tropical Húmedo y Muy Húmedo (4,23-6,77%) y Tropical Estacionalmente Seco (4,65-6,05%).

En las especies del piso Estacionalmente Seco se encuentra la mayor concentración foliar de N y en los pisos Tropical Húmedo-Muy Húmedo se hiperacumulan los elementos Al y B. La baja concentración foliar de nutrientes en las especies del piso Estacionalmente Seco es de gran importancia para la reforestación puesto que es aquí donde se plantan las especies de mayor relevancia económica en Costa Rica y en el resto del mundo. Al respecto, Raulino *et al.* (2020) mencionan que, en los Bosques Húmedos Tropicales de Pernambuco, Brasil las especies son más eficientes en la utilización de N y Mg

mientras que en los Bosques Secos Tropicales las especies son más eficientes en el uso de P y K.

Variación de la concentración foliar en el ecosistema Tropical Premontano

En ese ecosistema domina la vegetación natural siempre verde con una cantidad moderada de epífitas y algunas especies deciduas durante la estación seca. El requerimiento altitudinal de cada especie (Tabla 1) puede ser diferente al del bioclima de muestreo, definido por varios autores (p.e. Bolaños y Watson 1993, Badilla *et al.* 2002, Pancel 2015) con un rango de precipitación anual entre 2000 y 4000 mm, una biotemperatura que varía entre 17,5 y 24,0°C y un rango de elevación que oscila entre 250 y 1400 m en la vertiente Caribe y entre 700 y 1600 m en la vertiente pacífica de la América Central.

***Alnus acuminata*.** Los valores de concentración foliar de la especie en el presente estudio disminuyeron en el orden (%): N (3,57) > K (1,13) > Ca (0,46) > P (0,28) > S (0,19) ≈ Mg (0,18) y (mg.L⁻¹) Al (165) > Na (77) ≈ Fe (76) > Mn (39) > B (33) > Cu (19) > Zn (15), considerándose altos los contenidos y los rangos de variación de N, P y K y bajos los de Ca (Tabla 2). La información del presente trabajo coincide con la de Segura *et al.* (2006) en Andisoles de Costa Rica, pero es de mayor magnitud que la determinada para *A. acuminata* en Andisoles de Colombia (Escobar *et al.* 1993) y para otras especies del género *Alnus* que crecen en otros tipos de suelo (Rodríguez *et al.* 1984, Sharma 1993, Mills *et al.* 1996).

Rodríguez *et al.* (1984) y Cervantes y Rodríguez (1992) mencionan que los valores más elevados de N y P ocurren durante la época lluviosa, hecho atribuible a una mayor actividad en los nódulos de *Frankia* que aumentan la fijación y translocación de N y por asocio de P durante esta estación. Segura *et al.* (2006) mencionan que las concentraciones de Mg, Fe, Zn, Mn, Cu y B no disminuyen durante el año. Las concentraciones foliares de N, P y K concuerdan con las reportadas en la literatura para árboles del género *Alnus* (Rodríguez *et al.* 1984, Mills y

Jones 1996, Sharma 1993, Segura *et al.* 2006) y las de Ca como bajas para 40 especies forestales Tropicales y SubTropicales (Drechsel y Zech 1991). Los valores de Mn se consideran bajos en relación con los de toxicidad de Mn (380-640 mg.kg⁻¹) mencionados por Alvarado *et al.* (1997) y Alvarado y Raigosa (2012).

Cordia alliodora. Los valores de concentración foliar de la especie en el presente estudio disminuyen en el orden (%): N (3,45) > Ca (3,29) > K (1,24) > Mg (1,02) > S (0,18) > P (0,15) y (mg.L⁻¹) Al (235) > Fe (162) > Na (48) > Mn (40) > Zn (33) > B (27) > Cu (15) (Tabla 2) donde se notan valores altos de N, Ca, K y Mg refleja el hecho de que la especie prefiere suelos de fertilidad natural media a alta. Al comparar los ámbitos de variación foliar hallados en el presente estudio con los valores de referencia internacional para la especie (Tabla 2) se nota que para el caso del K y el Al los valores presentan niveles adecuados, para los casos del N y Fe la mayoría pueden considerarse como adecuados y pocos como ligeramente bajos o ligeramente altos, los de Ca, Mg, P y S como ligeramente bajos y los de Cu, Zn, B y Mn como bajos en relación con lo encontrado por varios autores en plantaciones del Bosque Tropical Húmedo (Cadena 1989, Drechsel y Zech 1991, Zech y Drechsel 1992, Bergmann *et al.* 1994, Herrera y Finegan 1997, Davidson *et al.* 1998).

En las llanuras de la Zona Norte de Costa Rica, Bergmann *et al.* (1994) estudiaron la variación del contenido de la concentración foliar en 21 plantaciones de laurel con valores de árboles cloróticos menores que los encontrados en los árboles no cloróticos con concentraciones de N (2,4 vs 3,4%), P (0,15 vs 0,18%), Mn (56 vs 68 mg.kg⁻¹) y Cu (12 vs 20 mg.kg⁻¹). En algunas situaciones la especie puede presentar valores foliares bajos causados por mal drenaje en las vegas de los ríos (Peck 1976) o en suelos en laderas degradadas abandonadas recientemente donde el sistema radical en suelos compactados por pastoreo es deficiente y la competencia de

gramíneas es fuerte (Johnson y Morales 1972, Greaves y McCarter 1990).

Cedrela odorata. Los valores de concentración foliar de la especie en el presente estudio disminuyen en el orden (%): N (3,22) > Ca (2,10) > K (0,58) > P (0,24) = S (0,24) > Mg (0,18) y (mg.L⁻¹) Fe (106) > Al (57) > Na (47), B (34) > Mn (33) = Zn (33) > Cu (6) (Tabla 2). Los valores son comparables a los mencionados por otros autores en el Trópico Premontano (Zech y Drechsel 1992, Webb *et al.* 2000, Ramírez 2014). La concentración foliar de nutrientes del cedro no varía significativamente con la edad de los árboles (Ramírez 2014) y según Zech y Drechsel (1992) y Webb *et al.* (2000) se consideran como deficientes los valores menores o iguales a N (1,42%), Mn (22 mg.kg⁻¹) y Cu (2 mg.kg⁻¹).

Variación de la concentración foliar en el ecosistema Tropical Húmedo a Muy Húmedo

El Bosque Húmedo Pluvial se encuentra a una elevación media de 570 msnm (240-1200 msnm), tiene una precipitación media anual de 2200 mm (1500-2400 mm), la temperatura media anual es de 22°C (19-25°C) y el periodo efectivamente seco oscila entre 1-3 meses. El Bosque Muy Húmedo Tropical presenta un rango de precipitación promedio anual que va de los 4000 a los 5500 mm, una temperatura promedio anual comprendida entre los 24°C y los 25°C y un periodo seco entre los 0-2 meses y se caracteriza por tener alta biodiversidad, especies siempreverdes con gomas, de alturas entre 40 a 50 m, árboles altos y rectos, con troncos libres de ramas en los primeros 20 a 30 m y abundantes epífitas y lianas (información resumida de Bolaños y Watson 1993, Condit *et al.* 2011, Condit *et al.* 2013, Pancel 2015).

Vochysia guatemalensis. Los valores de concentración foliar de *V. guatemalensis* en el presente estudio disminuyen en el orden (%): N (2,37) > Mg (0,94) > P (0,54) > K (0,34) > S (0,21) > Ca (0,10) y (mg.L⁻¹) Al (22 172) > Na (401) > B (112) > Fe (90) > Cu (26) > Zn (14) > Mn (6)

(Tabla 3). Los valores difieren a los encontrados previamente por otros investigadores (Pérez *et al.* 1993, González y Fisher 1997) quienes reportan concentraciones similares de Ca y K y menores de B con poca variación interanual en plantaciones entre 2 y 9 años de edad. La secuencia de concentración de los elementos menores presenta una tendencia a mantener niveles adecuados como mecanismo de adaptación a sitios degradados (Fisher 1995, Haggard *et al.* 1997, Carpenter *et al.* 2004). Los elevados valores de Al foliar permiten considerar el elemento como hiperacumulado y de acuerdo con Pérez *et al.* (1993) y González y Fisher (1997), por almacenar Al tanto en el follaje como en las raíces. Se consideran como bajos los contenidos foliares de Ca y altos los de N, P, Na y B mientras que los demás elementos concuerdan con los valores reportados en la literatura para la especie (Pérez *et al.* 1993, González y Fisher 1997, Montagnini 2000).

La variación del contenido foliar en la especie se atribuye a los cambios estacionales (Camacho 2014), su reciclaje de nutrientes (Montagnini *et al.* 1993, Di Stéfano y Fournier 1998, Arias *et al.* 2011) y la variación causada por la procedencia genética (González y Fisher 1997). Camacho (2014) indica que la diferencia del contenido foliar en plantaciones de 2 a 21 años de edad causa un incremento de los contenidos foliares de P, Mg y Cu, que el contenido de P foliar es bajo y que se presentan interacciones entre sí y con otros nutrientes entre los contenidos foliares de P, S, Zn y Al.

***Vochysia ferruginea*.** Los valores de concentración foliar de esta especie disminuyen en el orden (%): N (1,70) > P (0,68) ≈ Mg (0,67) > K (0,15) ≈ S (0,14) > Ca (0,10) y (mg.L⁻¹) Al (13470) > B (130) > Fe (108) > Na (80) > Cu (19) > Mn (14) ≈ Zn (13) (Tabla 3) y no coinciden con la secuencia descrita por Herrera y Finegan (1997). La especie muestra valores de concentración foliar altos en P, Al y B y bajos de Ca, contrario a la idea de que la baja tasa de descomposición de los residuos en plantaciones indica que la concentración de N, P y K en el tejido foliar es baja

(Horn y Montagnini 1999). Reyes (1997) menciona de manera preliminar que altos contenidos de arcilla en posiciones cóncavas del relieve pueden causar anegamiento y afectar negativamente los contenidos foliares de Zn, P y K. Como ha sido mencionado con anterioridad (Haridasan 1982, Geoghegan y Sprent 1996) la gran cantidad de Al absorbida por la especie no va en detrimento de las concentraciones foliares de otros elementos, por lo que se esperaba que la condición de tolerancia a la acidez del suelo se vea favorecida en el caso de que la fertilidad natural de los ecosistemas sea mayor.

***Terminalia amazonia*.** Los valores de concentración foliar del amarillón disminuyen en el orden (%): N (1,71) > Mg (1,40) > P (0,59) > K (0,23) > S (0,12) > Ca (0,10) y (mg.L⁻¹) B (164) > Fe (80) > Na (76) > Al (61) > Cu (46) > Zn (14) > Mn (10) (Tabla 3). Se considera bajo el contenido foliar de Ca y elevados los de P, B y Cu, mientras que de acuerdo con Nichols *et al.* (1997) los valores de N, P y K se encuentran dentro del rango normal descrito para la especie y sobre los niveles críticos de N (1,05%) y P (0,09%) mencionados por los mismos autores. Montenegro (2005) indican que las concentraciones foliares de la especie aumentan durante la época lluviosa y las de N, K, Ca y Mg son mayores en plantaciones mixtas de 3 años que las encontradas en plantaciones puras de la misma edad. El efecto de sitio sobre la concentración foliar de *T. amazonia* es mínimo pues los valores no difieren mucho entre ecosistemas de fertilidad media a baja, fracos a arcillosos en terrenos planos y ondulados (Montagnini 2000, Fernández-Moya y Alvarado 2012).

Variación de la concentración foliar en el ecosistema Tropical Estacionalmente Seco

El Bosque Tropical Estacionalmente Seco en Centroamérica está conformado por vegetación arbustiva, parches de vegetación sabanoide y cerca de los ríos de bosque caducifolio o siempreverde (Gómez 1986). Según varios autores (Murphy y Lugo 1995, Leiva 2007, Pancel 2015;

Jiménez *et al.* 2015) presenta un régimen de temperatura media anual de 22°C (14-25°C), una elevación media de 750 msnm (300-1950 msnm) y se encuentra restringido por una precipitación media anual de 1400 mm (1000 a 2100 mm.año⁻¹), un periodo seco de 3 a 6 meses de longitud con una alta variabilidad y distribución de la lluvia. Este ecosistema está sometido a quemas periódicas frecuentes en una región con una cantidad de lluvia anual que genera un déficit hídrico significativo a una elevación media de 750 msnm (300-1950 msnm). Se lo encuentra sobre suelos neutros a ligeramente básicos y un periodo seco en el cual los árboles, particularmente leguminosas fijadoras de N tienden a perder el follaje y las raíces finas (Ordóñez 2003), de manera que durante la época de alta luminosidad no fotosintetizan debido a la limitante hídrica (Alvarado *et al.* 2018).

En la Tabla 4 se presenta la variación de la concentración foliar de las especies *Gmelina arborea*, *Tectona grandis* y *Pachira quinata* plantadas en el piso ecológico conocido como Bosque Tropical Estacionalmente Seco a una elevación inferior a 900 msnm de la Costa Pacífica de América Central desde México hasta Panamá.

Gmelina arborea. Los resultados del presente estudio mostraron que la concentración foliar de nutrientes en plantaciones de melina (Tabla 4) varían de mayor a menor en la secuencia (%) N (2,58) > Ca (1,62) > K (1,04) > Mg (0,40) > P (0,23) > S (0,15) y (mg.L⁻¹) Fe (65) > B (58) > Mn (52) > Zn (39) ≈ Na (38) > Al (27) > Cu (9), sin que ningún valor se considere como hipercumulado. En general, los rangos se encuentran dentro de las concentraciones consideradas como adecuados para la especie por Murillo y Alvarado (2012), excepto los de S (0,15-0,16%) que se consideran elevados y los de Al (38-68 mg.L⁻¹) estimados como bajos según los mismos autores. En plantaciones en pendientes fuertes las concentraciones de Mn foliar tienden a ser más bajas que el valor de la mediana del presente trabajo (Stuhrmann *et al.* 1994) en suelos ácidos y erosionados, con baja disponibilidad de N y P

en la Zona Norte de Costa Rica donde estos elementos limitan el desarrollo de la especie (Rojas y Murillo 2004).

Varios estudios de concentración foliar de nutrientes en melina provienen de Centro América (Stuhrmann *et al.* 1994, González 1996, Murillo y Alvarado 2012, Avellán 2012) y muchos otros de zonas Tropicales fuera de la región (Drechsel y Zech 1991, Sampaio y Huber 1999, Paudyal 2012, Caguasango y Cadenas 2012). En plantaciones adultas las mayores concentraciones de K se encuentran en la parte superior, las más altas de Ca en la parte media de la copa (Sampaio y Huber 1999) y Evans (1979) encontró que las concentraciones de N, P, Zn y B disminuyen y las concentraciones de Ca y Fe aumentan con el incremento de la sombra en la copa. En Costa Rica no se ha encontrado este efecto de copa, aunque si encontraron mayores concentraciones foliares de N, K, Fe y Al en la época lluviosa que en la época seca donde se obtuvo mayores concentraciones de Ca y Mn (Avellán 2012, Murillo y Alvarado 2012). De la información disponible, se concluye que los contenidos foliares de la especie varían con el tipo de suelo pues altos valores de saturación de Al inhiben la absorción de N y P, la intensidad lumínica del sitio, la edad fisiológica de las hojas, la posición de las hojas en la copa, la edad del árbol y la época de muestreo.

Varios investigadores (Drechsel y Zech 1991, Stuhrmann *et al.* 1994, Onweremadu 2007, Murillo y Alvarado 2012) han determinado niveles críticos de concentración foliar, sin embargo, la información aún no se considera suficiente pues no se ha correlacionado con ensayos de respuesta a la adición de los diferentes nutrientes a nivel de campo. Stuhrmann *et al.* (1994) mencionan como valores críticos a nivel foliar concentraciones (%) de N < 2,50, P < 0,15, S < 0,13, K < 0,80, Mn > 200 mg.L⁻¹ y de la relación K/Mg < 2 a lo que se añade el valor de Ca < 0,30 mencionado por Onweremadu (2007).

Tectona grandis. Los resultados del presente trabajo (Tabla 4) muestran que la

concentración foliar de nutrientes en plantaciones de teca varían de mayor a menor en la secuencia (%) N (1,98) > Ca (1,25) > K (0,76) > Mg (0,35) > S (0,15) > P (0,14) y (mg.L⁻¹) Fe (56) > Mn (45) > Al (31) > B (26) = Zn (26) > Na (20) > Cu (10), sin que ningún valor sea tan alto como para considerarlo hiperacumulado ni por debajo de los niveles críticos mencionados en la literatura (Nwoboshi 1975, Dreschel y Zech 1991, Montero 1999, Murillo *et al.* 2014). Sus rangos se encuentran dentro de los valores considerados como adecuados por Portuguez (2012) y Murillo (2013).

La variación del contenido foliar en teca se atribuye principalmente a efectos de la edad de la plantación, la época del año, la calidad del sitio y la densidad de muestreo (Drechsel y Zech 1991, Montero 1999, Siddiqui *et al.* 2009, Portuguez 2012, Fernández-Moya *et al.* 2013, Fernández-Moya 2014). Se ha establecido que i) el N, P y K foliares decrecen durante los primeros años de crecimiento debido a reducciones de la productividad de las plantaciones con la edad, ii) que en las plantaciones más jóvenes aumentan las concentraciones foliares de Ca y Mg en función de la demanda fisiológica de los árboles más viejos y iii) que permanecen relativamente estables en el tiempo (Nwoboshi 1984, Negi *et al.* 1995, Kumar *et al.* 2009). Dreschel y Zech (1991) y Murillo *et al.* (2014) indican que el contenido foliar de Ca y Mg son mayores en sitios de crecimiento alto y que la teca crece bien aún a niveles de Cu en el suelo superior a los 200 mg.L⁻¹. Fernández-Moya (2014) propone un umbral de 0,12% como nivel crítico de la concentración foliar de P en plantaciones de teca de América Central en base a un caso de estudio en plantaciones de teca en Panamá y revisión de literatura al respecto.

Pachira quinata. Se encontró que la mediana de concentración de macronutrientos (Tabla 4) siguió el orden (%) N (2,45) > Ca (1,81) > K (0,84) > Mg (0,37) > P (0,25) > S (0,16) y los microelementos (mg.L⁻¹) Fe (87) > Na (73) > Al (47) > Zn (30) > Mn (24) > B (15) > Cu (8). Los valores normales encontrados en el presente

estudio concuerdan bien con los rangos de variación mencionados para concentración foliar de los elementos estudiados por otros autores y los rangos de variación son normales excepto para Na, Fe y Al que varían ampliamente y son nuevos a la literatura para S, Na, B y Al. La variación de la concentración foliar del pochote (Tabla 4) se compara con los valores adecuados, críticos y de deficiencia definidos por varios autores en Costa Rica (Drechsel y Zech 1991, Vázquez y Ugalde 1995, Vallejos 1996, Montero 1999) y por Caguasango (2017) en Colombia.

Montero (1999) demuestra que en plantaciones en el Pacífico Estacionalmente Seco de Costa Rica los contenidos foliares de K y P de pochote son 14 y 12% mayores en rodales entre 2 y 5 años y los de Ca y Mg superiores en un 40% a los encontrados en plantaciones de 8-25 años. Caguasango (2017) encontró una disminución no significativa de los contenidos foliares de N y Mg una tendencia altamente significativa de la concentración foliar de Cu (8-10 mg.L⁻¹) con la edad de los rodales y el índice de sitio y menor pero significativa con la concentración de Zn foliar. Al comparar los valores foliares encontrados con el crecimiento de las plantaciones en sitios de clases baja, media o alta Montero (1999) y Caguasango (2017) mencionan para concentraciones foliares "críticas" porcentuales de Ca < 2,00, de K < 1,1, de P < 0,26 y de Zn < 10 mg.L⁻¹, valores comunes en las plantaciones de Colombia de más de 15 años de edad. Montero (1999) encontró: i) un aumento de la concentración foliar de Mg conforme su contenido disponible en el suelo se eleva hasta 8 cmol(+).L⁻¹, ii) que 0,50 cmol(+).L⁻¹ K disponible en el suelo es suficiente para mantener su nivel foliar crítico sobre 1,1% y iii) un nivel calculado por modelaje superior a 10 mg P.L⁻¹ para lograr mantener en más de un 0,26% de P foliar. La concentración foliar de *P. quinata* en las plantaciones en el Bosque Seco Tropical de Bolívar, Colombia (Caguasango 2017) menciona valores deficientes de Ca (< 2,00%) y de Zn (< 10 mg.L⁻¹) en plantaciones de 17 a 24 años de edad. En relación con su posible deficiencia se considera que los valores normales del presente

trabajo son adecuados para el crecimiento de la especie excepto los de Ca, K y Zn que podrían considerarse como bajos.

CONCLUSIONES

La concentración foliar porcentual (suma de todos los elementos analizados para cada especie) muestra cómo los valores son propios para cada especie y sus rangos de variación por sitio son mayores en el piso Premontano (5,83-9,36%) y menores pero similares entre sí en el Tropical Húmedo-Muy Húmedo (4,23-6,77%) y en el Tropical Estacionalmente Seco (4,65-6,05%).

Los rangos mencionados se ven significativamente afectados por la concentración foliar de los elementos mayoritarios como la concentración foliar de Al en el piso Tropical Húmedo-Muy Húmedo y la de N en el Estacionalmente Seco.

En orden descendente la concentración porcentual foliar total de las especies estudiadas fue *C. alliodora* (9,36), *V. guatemalensis* (6,77), *C. odorata* (6,58), *G. arborea* (6,05), *P. quinata* (5,91), *A. acuminata* (5,83), *V. ferruginea* (4,81), *T. grandis* (4,65) y *T. amazonia* (4,23).

Las 3 primeras especies mencionadas elevan su concentración foliar total debido a los aportes de N, Ca y Mg en *C. alliodora* y de Al, Na y B en *V. guatemalensis* y *V. ferruginea*.

Para varias de las especies estudiadas se generaron valores de concentración foliar considerados como nuevos a la literatura mundial, en particular de elementos menores.

En los pisos Tropical Húmedo-Muy Húmedo la presencia de *V. guatemalensis* y *V. ferruginea* mostró elevados valores en mg.L⁻¹ de Al (13 470 - 22 172) > Na (401) > B (112-130) y además concentraciones porcentuales elevadas de P (0,54-0,68). La especie *T. amazonia* también presenta concentraciones porcentuales altas de P (0,59), en mg.L⁻¹ de B (164) y de Cu (46).

En el Bosque Tropical Estacionalmente Seco ninguna de las especies estudiadas (*G. arborea*, *T. grandis* y *P. quinata*) presentó

concentraciones elevadas de ningún elemento de los estudiados.

En el piso Premontano se encontró valores porcentuales elevados de N (3,57) > K (1,13) en *A. acuminata*, de N (3,45) > Ca (3,29) > K (1,24) > Mg (1,02) en *C. alliodora* y de N (3,22) en *C. odorata*.

AGRADECIMIENTOS

Varias personas y empresas colaboraron desinteresadamente en el proceso de colectar el material vegetal del presente trabajo en sus bosques y plantaciones a los cuales les quedamos imperecederamente agradecidos: Ricardo Luján y Felipe Hidalgo de la empresa Barca SA, Ernesto Castillo datos de su tesis de Maestro en Ciencias en Tabasco, Méjico, Alvaro Castillo de la Compañía Nacional de Fuerza y Luz, Folker Kottman y Vinicio Ríos de la empresa Panamerican Woods, José E. Villalobos y Jaime Raigosa de la empresa privada, Edwin Estuardo Vaides datos de su tesis de Magister Scientae en Guatemala, Luis Salazar de CoopeAgri RL y Carlos L. Sandí y Rolando Camacho en terrenos de la EARTH y sus alrededores. Al procurar información pertinente al tema, fue invaluable la ayuda de Susana Aguilar y Gilbert Fuentes encargados de la unidad de documentación de la OET quienes permitieron ubicar pocas publicaciones de mucho valor científico desde 1934 y la gran mayoría de ellas a partir de 1990. Se agradece al Dr. Raúl Jaramillo y la Mg. Sc. Floria Bertsch por su colaboración institucional en el financiamiento parcial del trabajo.

LITERATURA CITADA

- Alvarado, A. 2015. Plant nutrition in tropical forestry. In Pancel, L; Köhl, M (eds.). Tropical Forestry Handbook, 2. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. p. 1113-1202.
- Alvarado, A; Herrera, B; Orlich, T. 1997. Variación de las concentraciones foliares de especies utilizadas en proyectos de reforestación en Costa Rica. In Tercer Congreso Forestal Nacional: Unidos por el Desarrollo del Recurso Forestal Ante el Próximo

- Milenio. Resúmenes de ponencias. San José, Costa Rica. p. 302-304.
- Alvarado, A; Mora, A; Chacón-Madrigal, E; Villalobos, JE; Sandí, CL. 2018. Concentración foliar de macro-y micro-nutrientos en cuatro leguminosas maderables del trópico Estacionalmente Seco de Costa Rica. Revista Biología Tropical 66(3):969-983.
- Alvarado, A; Raigosa, J. 2012. Nutrición y fertilización forestal en regiones tropicales. San José, Costa Rica. Asociación Costarricense de la Ciencia del Suelo. 411 p.
- Arias, D; Calvo-Alvarado, J; Richter, DDB; Dohrenbusch, A. 2011. Productivity, aboveground biomass, nutrient uptake and carbon content in fast-growing tree plantations of native and introduced species in the Southern Region of Costa Rica. Biomass and Bioenergy 35(5):1779-1788.
- Avellán, MJ. 2012. Determinación y variación de la concentración foliar de nutrientes de *Gmelina arborea* Roxb. en Osa, Golfito y Corredores, Costa Rica. Tesis Lic. Heredia, Costa Rica, Universidad Nacional. 87 p.
- Badilla, Y; Murillo, O; Obando, G. 2002. Efecto de la zona de vida y la altitud en la mortalidad y adaptabilidad al primer año de especies forestales en la Cordillera Volcánica Central, Costa Rica. Agronomía Costarricense 26(1):7-15.
- Baker, AJM; Brooks, R. 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements. A review of their distribution, ecology and phytochemistry. Biorecovery 1(2):81-126.
- Ballard, R. 1984. Fertilization of plantations. In Bowen, GD; Nambiar, KS (eds.). Nutrition of Plantation Forests. San Diego, California, USA, Academic Press. p. 327-360.
- Bergmann, C; Stuhrmann, M; Zech, W. 1994. Site factors, foliar nutrient levels and growth of *Cordia alliodora* plantations in the humid lowlands of Northern Costa Rica. Plant and Soil 166(2):193-202.
- Binkley, D. 1986. Forest nutrition management. New York, USA, John Wiley & Sons. 290 p.
- Boardman, R; McGuire, DO. 1990. The role of zinc in forestry. I. Zinc in forest environments, ecosystems and tree nutrition. Forest Ecology and Management 37(1-3):167-205.
- Bolaños, RA; Watson, V. 1993. Mapa ecológico de Costa Rica: según el sistema de clasificación de zonas de vida del mundo de LR Holdridge. San José, Costa Rica, Centro Científico Tropical. s.p.
- Breulmann, G; Ninomiya, I; Ogino, K. 1996. Distribution characteristics of mineral elements in tree leaves of a mixed dipterocarp forest in Sarawak, Malaysia. Tropics 6(1/2):29-38.
- Cadena, ME. 1989. Análisis nutricional de la especie *Cordia alliodora* asociado a hidroponía. Colombia Forestal 3(5):6-16.
- Caguasango, SM. 2017. Predicción de rendimientos para plantaciones de *Acacia mangium* Willd. en la altillanura plana a partir de variables biofísicas. Tesis M.Sc. Bogotá, Colombia, Universidad Nacional de Colombia. 96 p.
- Caguasango, SM; Cadena, ME. 2012. Modelación de la calidad de índice de sitio-suelo sitio específico mediante criterios de disponibilidad de nutrientes en plantaciones de *Gmelina arborea* y *Pachira quinata* en bosque seco tropical (Zambrano-Bolívar). Tesis Lic. Bogotá, Colombia, Universidad Distrital Francisco José de Caldas. 230 p.
- Camacho, M. 2014. Modelos de absorción de nutrientes como herramientas para hacer recomendaciones de manejo en plantaciones de *Vochysia guatemalensis* Donn. Smith en el Trópico Muy Húmedo de Costa Rica. Tesis Lic. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 103 p.
- Carpenter, FL; Nichols, JD; Sandi, E. 2004. Early growth of native and exotic trees planted on degraded tropical pasture. Forest Ecology and Management 196(2-3):367-378.
- Cervantes, E; Rodríguez, C. 1992. Relationships between the mycorrhizal and actinorhizal symbioses in non-legumes. Methods in Microbiology 2:417-432.
- Chacón-Madrigal, E; Wanek, W; Hietz, P; Dullinger, S. 2018. Traits indicating a conservative resource strategy are weakly related to narrow range size in a group of Neotropical trees. Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics 32:30-37.
- Chaves-Corea, R. 2021. Contenido foliar de nutrientes en especies arbóreas latifoliadas de Costa Rica. Tesis M.Sc. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 181 p.
- Chenery, EM; Sporne K. 1976. A note on the evolutionary status of aluminium-accumulators among dicotyledons. New Phytologist 76:551-554.
- Condit, R; Engelbrecht, BMJ; Delicia-Pino, D; Pérez, R; Turner, BL. 2013. Species distributions in response to individual soil nutrients and seasonal drought across a community of tropical trees. Proceedings of the National Academy of Sciences 110(13):5064-5068.
- Condit, R; Pérez, R; Daguerre, N. 2011. Trees of Panama and Costa Rica. Panamá, Panamá, Princeton Field Guides Series. 494 p.
- Corrales, M; Bertsch, F; Bejarano, JA. 2005. Los laboratorios de análisis de suelos y foliares en Costa Rica: Informe del comité de laboratorios de análisis de suelos, plantas y aguas. Agronomía Costarricense 29(3):125-135.
- Davidson, R; Gagnon, D; Mauffette, Y; Hernández, H. 1998. Early survival, growth and foliar nutrients in native Ecuadorian trees planted on degraded volcanic soil. Forest Ecology and Management 105(1-3):1-19.
- Di Stéfano, JF; Fournier, LA. 1998. Biomasa aérea, concentración de nutrientes y daños en árboles

- de *Vochysia guatemalensis* en un monocultivo de cuatro años, Tabarcia, Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 22(2):235-241.
- Drechsel, P; Zech, W. 1991. Foliar nutrient levels of broad-leaved tropical trees: a tabular review. *Plant and Soil* 131(1):29-46.
- Drechsel, P; Zech, W. 1993. Mineral nutrition of tropical trees. In Pancel, L (ed.). *Tropical Forestry Handbook*, Springer Verlag, Berlin, Vol. 1. p. 515-567.
- Driessche van den, R. 1974. Prediction of mineral nutrient status of trees by foliar analysis. *The Botanical Review* 40(3):347-394.
- Escobar, ML; Ortiz, JL; López, FL. 1993. Diagnóstico de daños nutricionales en cuatro especies forestales empleadas en reforestación. Medellín, Colombia, INDERENA. 88 p.
- Evans, J. 1979. The effects of leaf position and leaf age in foliar analysis of *Gmelina arborea*. *Plant and Soil* 52(4):547-552.
- Fallas, JL. 2014. Respuesta a la fertilización de la teca (*Tectona grandis* L.f.) con NPK en ultisoles de la zona norte de Costa Rica. Tesis Lic. Cartago, Costa Rica, Instituto Tecnológico de Costa Rica. 72 p.
- Fernández-Moya, J. 2014. Gestión de la fertilidad de suelos y la nutrición de plantaciones de teca (*Tectona grandis* Lf) en América Central. Tesis Ph.D. Madrid, España, Universidad Politécnica de Madrid. 259 p.
- Fernández-Moya, J; Alvarado, A. 2012. Nutrición y fertilización de *Terminalia amazonia*. Capítulo 19. In Alvarado, A; Raigosa, J (eds.). *Nutrición y fertilización forestal en regiones Tropicales*. San José, Costa Rica, Asociación Costarricense de la Ciencia del Suelo. p. 341-351.
- Fernández-Moya, J; Murillo, R; Portuguez, E; Fallas, JL; Ríos, V; Kottman, F; Alvarado, A. 2013. Nutrient concentration age dynamics of teak (*Tectona grandis* Lf) plantations in Central America. *Forest Systems* 22(1):123-133.
- Fernando, DR; Guymer, G; Reeves, RD; Woodrow, IE; Baker, AJM; Batianoff, GN. 2009. Foliar Mn accumulation in eastern Australian herbarium specimens: prospecting for 'new' Mn hyperaccumulators and potential applications in taxonomy. *Annals of Botany* 103(6):931-939.
- Fisher, RF. 1995. Amelioration of degraded rain forest soils by plantations of native trees. *Soil Science Society of America Journal* 59(2):544-549.
- Fonseca, W; Alice, FE; Rojas, JM; Villalobos, R; Porras, J; Spínola, M. 2016. Construcción de funciones alométricas para Costa Rica en el contexto del Proyecto de Protección Ambiental a través de la Protección de los Bosques de Centro América (Informe final), Costa Rica. 29 p.
- Geoghegan, IE; Sprent, JI. 1996. Aluminum and nutrient concentrations in species native to central Brazil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 27(18-20):2925-2934.
- Gómez, LD. 1986. *Vegetación de Costa Rica*. San José, Costa Rica, Editorial de la Universidad Estatal a Distancia (EUNED). 327 p.
- González, E. 1996. Tropical tree species for reforestation: studies on seed storage, foliar nutrient content and wood variation. Tesis Ph.D. Texas, USA, A&M Univ., College Station. 124 p.
- González, E; Fisher, RF. 1997. Variación en la composición elemental foliar en árboles silvestres maduros y entre familias y procedencias de *Vochysia guatemalensis* en Costa Rica. *Silvae Genetica* 46(1):45-50.
- Greaves, A; McCarter, PS. 1990. *Cordia alliodora* a promising tree for tropical agroforestry: Tropical Forestry Papers 22. Oxford Forestry Institute. University of Oxford. 37 p.
- Guevara, G. 1988. Experiencias colombianas con cedro (*Cedrela odorata* L.). Corporación Nacional de Investigación y Fomento Forestal (CONIF). Serie de Documentación, N° 12, Bogotá, Colombia. 86 p.
- Haggar, J; Wightman, K; Fisher, RF. 1997. The potential of plantations to foster woody regeneration within a deforested landscape in lowland Costa Rica. *Forest Ecology and Management* 99(1-2):55-64.
- Haridasan, M. 1982. Aluminium accumulation by some Cerrado native species of central Brazil. *Plant and Soil* 65(2):265-273.
- Herrera, B. 1996. Evaluación del efecto del sitio en la productividad de las poblaciones de dos especies dominantes en un bosque tropical de la tercera fase de la sucesión secundaria en Costa Rica. Tesis M.Sc. Turrubalba, Costa Rica, CATIE. 152 p.
- Herrera, B; Finegan, B. 1997. Substrate conditions, foliar nutrients and the distributions of two canopy tree species in a Costa Rican secondary rain forest. *Plant and Soil* 191(2):259-267.
- Horn, N; Montagnini, F. 1999. Litterfall, litter decomposition and maize bioassay of mulches from four indigenous tree species in mixed and monospecific plantations in Costa Rica. *International Tree Crops Journal* 10(1):37-50.
- Jiménez, Q; Carrillo, E; Kappelle, M. 2015. The northern pacific lowland seasonal dry forest of Guanacaste and the Nicoya Peninsula. *Costa Rican Ecosystems*. p. 247-289.
- Johnson, P; Morales, R. 1972. A review of *Cordia alliodora* (Ruiz & Pav.) Oken. *Turrubalba* 22(2):210-220.
- Kalra, Y. 1998. *Handbook of reference methods for plant analysis*. Soil and Plant Analysis Council, Inc. Boca Raton, FLA, CRC Press. 300 p.
- Kitayama, K; Aiba, SI. 2002. Ecosystem structure and productivity of Tropical rain forests along altitudinal gradients with contrasting soil phosphorus pools on Mount Kinabalu, Borneo. *Journal of Ecology* 90(1):37-51.

- Klinge, H. 1985. Foliar nutrient levels of native tree species from Central Amazonia. 2. Campina. *Amazonia* 9(3):281-295.
- Klinge, H; Furch, K; Harms, E; Revilla, J. 1983. Foliar nutrient levels of native tree species from Central Amazonia. 1. Inundation forests. *Amazonia* 8(1):19-45.
- Kumar, JN; Kumar, RN; Kumar, BR; Sajish, PR. 2009. Quantification of nutrient content in the aboveground biomass of teak plantation in a Tropical dry deciduous forest of Udaipur, India. *Journal of Forest Science* 55(6):251-256.
- Lavender, DP. 1970. Foliar analysis and how is used: a review, Research Note 52, Paper 691, Corvallis, Oregon, School of Forestry, Oregon State University. 8 p.
- Lehto, T; Ruuhola, T; Dell, B. 2010. Boron in forest trees and forest ecosystems. *Forest Ecology and Management* 260(12):2053-2069.
- Leitenmaier, B; Küpper, H. 2013. Compartmentation and complexation of metals in hyperaccumulator plants. *Frontiers in Plant Science* 4(374):1-13.
- Leiva, JA. 2007. Regeneración arbórea y características edáficas en bosques secos tropicales desarrollados sobre la Meseta Ignimbritica de Santa Rosa, Noroeste de Costa Rica. Tesis M.Sc. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 148 p.
- Leyton, L. 1948. Mineral nutrient relationships of forest trees. *Forestry*. Abstr.9: p. 399-408.
- Lugo, AE; Martínez, OA; da Silva, JF. 2012. Aboveground biomass, wood volume, nutrient stocks and leaf litter in novel forests compared to native forests and tree plantations in Puerto Rico. *Bois et Forêts des Tropiques* 314(4):7-16.
- Ma, JF; Ueno, D; Zhao, FJ; McGrath, SP. 2005. Subcellular localization of Cd and Zn in the leaves of a Cd-hyperaccumulating ecotype of *Thlaspi caerulescens*. *Planta* 220(5):731-736.
- Mills, HA; Jones, JB. 1996. Plant analysis handbook II (revised). A practical sampling, preparation, analysis, and interpretation guide. Nº. 581.13 M657. Micromacro Publisher, Athens. 422 p.
- Mitchell, HL. 1934. Pot culture tests of forest soil fertility with observations on the effect of varied solar radiation and nutrient supply on the growth and nitrogen content of Scots and White Pine seedlings. Black Rock Forest, Bulletin s: 1-138. NY, USA, Cornwall-on-the-Hudson. s.p.
- Montagnini, F. 2000. Accumulation in above-ground biomass and soil storage of mineral nutrients in pure and mixed plantations in a humid Tropical lowland. *Forest Ecology and Management* 134(1-3):257-270.
- Montagnini, F; Sancho, F; González, E; Moulaert, A. 1993. Mixed-tree plantations with indigenous trees in the Atlantic lowlands of Costa Rica. In *Management and rehabilitation of degraded lands and secondary forests in Amazonia*. Proceedings of an International Symposium. Santarem, Pará, Brazil. IITF-USDA-Forest Service, Puerto Rico. p 161-169.
- Montenegro, E. 2005. Efecto del aporte de nutrientes de la biomasa de tres tipos de árboles de sombra en sistemas de manejo de café orgánico y convencional. Tesis M.Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 67 p.
- Montero, M. 1999. Factores de sitio que influyen en el crecimiento de *Tectona grandis* L.f. y *Bombacopsis quinata* (Jacq.) Dugand, en Costa Rica. Tesis M.Sc. Valdivia, Chile, Universidad Austral de Chile. 111 p.
- Murillo, RA. 1996. Evaluación de algunos factores ambientales que afectan la calidad de sitio a nivel de micrositio para melina (*Gmelina arborea* Roxb. plantada en suelos planos en la zona sur de Costa Rica. Tesis Lic. Heredia, Costa Rica, Universidad Nacional. 111 p.
- Murillo, RA. 2013. Contenido de nutrientes en la biomasa aérea de árboles de teca (*Tectona grandis* L.f.) en la cuenca del Canal de Panamá. Tesis M.Sc. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 126 p.
- Murillo, RA; Alvarado, A. 2012. Nutrición y fertilización de *Gmelina arborea*. Capítulo 15. In Alvarado A, Raigosa, J (eds.). Nutrición y fertilización forestal en regiones Tropicales. San José, Costa Rica, Asociación Costarricense de la Ciencia del Suelo. p. 281-294.
- Murillo, RA; Alvarado, A; Verjans, JM. 2014. Concentración foliar de nutrientes en plantaciones de teca en la cuenca del Canal de Panamá. *Agronomía Costarricense* 38(1):11-28.
- Murphy, PG; Lugo, AE. 1995. Dry forests of Central America and the Caribbean, Seasonally Dry Tropical Forest. p. 9-34.
- Negi, MS; Tandon, YN; Rawat, HS. 1995. Biomass and nutrient distribution in young teak (*Tectona grandis* Linn. f.) plantations in Tarai region of Uttar Pradesh. *Indian Forester* 121(6):455-464.
- Nichols, JD; Gillespie, AR; Richter, DD. 1997. Growth, foliar and nutrient status of *Terminalia amazonia* planted in southwestern Costa Rica. *Journal of Tropical Forest Science* 10:233-248.
- Nwoboshi, LC. 1975. Macronutrient deficiency symptoms in teak (*Tectona grandis* L.f.). Bulletin Nº. 6. Department of Forest Research Management, University of Ibadan. 12 p.
- Nwoboshi, LC. 1984. Growth and nutrient requirements in a teak plantation age series in Nigeria. II. Nutrient accumulation and minimum annual requirements. *Forest Science* 30(1):35-40.
- Onweremadu, EU. 2007. Pedogenic loss and uptake of calcium by *Gmelina* growing in an isohyperthermic Kandiudult. *Plant Science* 2:625-629.
- Ordóñez, H. 2003. Fenología de la copa y de las raíces finas de *Simarouba glauca* y *Dalbergia retusa* (cocobolo) con riego en una plantación mixta de Guanacaste.

- Tesis M.Sc. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 134 p.
- Pancel, L. 2015. Species files in tropical forestry. In Pancel, L.; Köhl, M. (eds.). Tropical Forestry Handbook, vol. N° 2. Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag. p. 1203-1220.
- Paudyal, BK. 2012. Forest nutrition research and its role in forest management. Institute of Forestry, Tribhuvan University Pokhara Campus, Pokhara. 223 p.
- Peck, RB. 1976. Selección preliminar de especies aptas para el establecimiento de bosques artificiales en tierra firme del litoral pacífico de Colombia. Boletín del Instituto Forestal Latinoamericano de Investigación y Capacitación (50):29-39.
- Pérez, J; Bornemisza, E; Sollins, P. 1993. Identificación de especies forestales acumuladoras de aluminio en una plantación forestal experimental ubicada en Sarapiquí, Costa Rica. Agronomía Costarricense 17(2):99-103.
- Portuguez, EM. 2012. Estimación de la extracción de nutrientes por parte aérea en plantaciones de teca (*Tectona grandis* Linn. f.) de las empresas Panamerican Woods y C&M Investment Group Ltda. en la Península de Nicoya, Guanacaste, Costa Rica. Tesis Lic. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 92 p.
- Pregitzer, KS; King, JS. 2005. Effects of soil temperature on nutrient uptake. In Nutrient Acquisition by Plants. Berlin, Heidelberg, Springer. p. 277-310.
- Ramírez, D. 2014. Absorción de nutrientes de cedro amargo (*Cedrela odorata* L.) como mecanismo de diagnóstico para mejorar el manejo de la fertilización de la especie para agricultores asociados a COOPEAGRI R.L. Tesis Lic. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 81 p.
- Rascio, N; Navari-Izzo, F. 2011. Heavy metal hyperaccumulating plants: how and why do they do it? And what makes them so interesting?. Plant Science 180(2):169-181.
- Raulino, WNC; Freire, FJ; Assunção, EADA; Ataide, KMPD; Silva, HVD; Silva, ACFD. 2020. Nutrition of tree species in tropical dry forest and rainforest environments. Revista Ceres 67(1):70-80.
- Reyes, CE. 1997. Estimación del incremento diamétrico en *Cordia alliodora* y *Vochysia ferruginea* a partir de variables del árbol y factores del sitio en un bosque secundario en Costa Rica. Tesis M.Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 134 p.
- Rodríguez-Barrueco, C; Miguel, C; Subramaniam, P. 1984. Seasonal fluctuations of the mineral concentration of alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) from the field. Plant and Soil 78(1-2):201-208.
- Rojas, F; Murillo, O. 2004. Botánica y ecología. Manual para productores de melina (*Gmelina arborea*) en Costa Rica, Cartago, Costa Rica. p. 3-21.
- Sampaio, L; Huber, W. 1999. Concentração e distribuição de nutrientes nas folhas de espécies florestais, na Amazônia Ocidental. Floresta e Ambiente 6(1):127-137.
- Segura, JM. 2005. Respuesta del jaúl (*Alnus acuminata* ssp. *arguta*) a la fertilización fosfórica en Andisoles del cantón de Coronado, Costa Rica. Tesis M.Sc. Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 151 p.
- Segura, JM; Castillo, Á; Alvarado, A; Blanco, F. 2006. Variación del contenido foliar de nutrientes de *Alnus acuminata*. Agronomía Costarricense 30(1):53-63.
- Sharma, E. 1993. Nutrient dynamics in Himalayan alder plantations. Annals of Botany 72(4):329-336.
- Siddiqui, M; Shah, A; Yaqoob, S. 2009. Chronosequence and crown strata effects on foliar nutrient concentrations in teak (*Tectona grandis* Lf) plantations. Pakistan Journal of Botany 41:3023-3034.
- Smith, FW; Loneragan, JF. 1997. Interpretation of plant analysis: concepts and principles. In Reuter, DJ; Robinson, JB (eds.). Plant Analysis and Interpretation Manual, Australia, CSIRO Publishing. p. 35-51.
- Soethe, N; Lehmann, J; Engels, C. 2008. Nutrient availability at different altitudes in a tropical montane forest in Ecuador. Journal of Tropical Ecology 24(4):397-406.
- Stuhrmann, M; Bergmann, C; Zech, W. 1994. Mineral nutrition, soil factors and growth rates of *Gmelina arborea* plantations in the humid lowlands of northern Costa Rica. Forest Ecology and Management 70(1-3):135-145.
- Tanner, EVJ; Vitousek, PA; Cuevas, E. 1998. Experimental investigation of nutrient limitation of forest growth on wet tropical mountains. Ecology 79(1):10-22.
- Vaides, EE. 2004. Características de sitio que determinan el crecimiento y productividad de teca (*Tectona grandis* Lf), en plantaciones forestales de diferentes regiones en Guatemala. Tesis M.Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 68 p.
- Vallejos, OS. 1996. Productividad y relaciones del índice de sitio con variables fisiográficas, edafoclimáticas y foliares para *Tectona grandis* L.f., *Bombacopsis quinata* (Jacq) Dugand y *Gmelina arborea* Roxb. en Costa Rica. Tesis M.Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 147 p.
- Van der Ent, A; Baker, AJM; Reeves, RD; Pollard, AJ; Schat, H. 2013. Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: facts and fiction. Plant and Soil 362(1-2):319-334.
- Vásquez, W; Ugalde, LA. 1995. Rendimiento y calidad de sitio para *Gmelina arborea*, *Tectona grandis*, *Bombacopsis quinata* y *Pinus caribaea*, en Guanacaste, Costa Rica. CATIE/ IDA/ FAO/ HOLANDA. Proyecto Madeleña-3. Turrialba, Costa Rica. Serie Técnica, Informe Técnico, N°. 256. 33 p.

- Webb, MJ; Reddell, P; Hambleton, A; Robson, KEN. 2000. Growth response of four tropical plantation timber species to increasing phosphorus supply and assessment of phosphorus requirements using foliar analysis. *New Forests* 20(2):193-211.
- Zech, W; Drechsel, P. 1992. Multiple mineral deficiencies in forest plantations in Liberia. *Forest Ecology and Management* 48(1-2):121-143.



Todos los derechos reservados. Universidad de Costa Rica. Este artículo se encuentra licenciado con Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Costa Rica. Para mayor información escribir a rac.cia@ucr.ac.cr

ESTUDIO PRELIMINAR DE ESPECIES DE *Fusarium* PRESENTES EN PIÑA (*Ananas comosus*) EN COSTA RICA

Mónica Blanco-Meneses^{1/*}, Oscar Castro-Zúñiga², Gerardina Umaña-Rojas³

Palabras clave: Síntomas; morfología; identificación molecular.

Keywords: Symptoms; morphology; molecular identification.

Recibido: 15/12/2020

Aceptado: 31/05/2021

RESUMEN

Introducción. La piña es el segundo cultivo de mayor importancia en Costa Rica, luego del banano. Se destaca la variedad Golden MD-2 como la de mayor demanda en Estados Unidos y Europa. En el 2019 el área de cultivo fue de 40 000 ha distribuidas en las zonas Norte, Atlántica y Pacífico. **Objetivo.** Determinar la presencia del patógeno *Fusarium guttiforme*, e identificar y caracterizar las especies de este género, presentes en el cultivo de piña en Costa Rica. **Materiales y métodos.** Se recolectaron 215 plantas y 20 frutos de diferentes regiones de Costa Rica en el periodo identificado 2015-2019 para un total de 38 175 ha del área sembrada de piña mediante un muestreo dirigido a síntomas relacionados a la “muerte descendente de piña”. Para la caracterización morfológica se realizaron observaciones del color del micelio, detalles de estructuras como macro y microconidios, clamidósporas y células conidiógenas en muestras previamente identificadas por medios moleculares. La identificación molecular se realizó a partir de 120 aislamientos con los marcadores moleculares

ABSTRACT

Preliminary study of *Fusarium* species in pineapple crop (*Ananas comosus*) in Costa Rica. Introduction. Pineapple is the second most important crop in Costa Rica, after banana. The Golden MD-2 variety standing out as the one with the highest demand in the United States and Europe. In 2019, the cultivation area was 40 000 ha distributed in the North, Atlantic and Pacific zones. **Objective.** To determine the presence of the pathogen *Fusarium guttiforme*, and to identify and characterize the present species of this genus, in the pineapple crop in Costa Rica. **Materials and methods.** 215 plants and 20 fruits were collected from different regions between the 2015-2019 in a total of 38 175 ha of the pineapple planted area through a sampling directed towards symptoms related to the “descending death of pineapple”. For the morphological characterization observations were made of the color of the mycelium, details of structures such as macro and microconidia, chlamydospores and conidiogenic cells in samples previously identified by molecular

* Autora para correspondencia. Correo electrónico: monica.blancomeneses@ucr.ac.cr

1 Universidad de Costa Rica, Facultad de Ciencias Agroalimentarias, Centro de Investigación en Protección de Cultivos, San José, Costa Rica.

 0000-0003-2642-3899.

2 Universidad de Costa Rica, Facultad de Ciencias Agroalimentarias, Centro de Investigación en Protección de Cultivos, San José, Costa Rica.

 0000-0002-5999-5749.

3 Universidad de Costa Rica, Facultad de Ciencias Agroalimentarias, Centro de Investigaciones Agronómicas, San José, Costa Rica.

 0000-0002-6368-5225.

ITS y TEF-1 α . **Resultados.** No se detectó *F. guttiforme* en plantaciones de piña en el período comprendido entre 2015-2019. Se identificaron 6 especies, *Fusarium ananatum*, *F. oxysporum*, *F. concolor*, *F. proliferatum*, *F. incarnatum* y *F. solani* cuyo número de accesión en el National Center of Biotechnology Information se adjunta en el presente artículo. Las especies *F. ananatum*, *F. oxysporum* y *F. proliferatum* han sido previamente descritas como patogénicas en piña. La presencia de *F. ananatum* en un 95% de los frutos recolectados, se relacionó con la enfermedad “pudrición del centro del frutículo”. *F. proliferatum* es generador de micotoxinas, lo cual podría representar un peligro para la salud animal y humana. Las otras especies no han sido reportadas en piña anteriormente. **Conclusión.** No se constató la presencia del patógeno *F. guttiforme*, aunque si se identificaron las especies de este género, presentes en el cultivo de piña en Costa Rica.

means. Molecular identification was carried out from 120 isolates with the molecular markers ITS and TEF-1 α . **Results.** *F. guttiforme* was not detected in pineapple plantations in the period between 2015-2019. Six species were identified, *Fusarium ananatum*, *F. oxysporum*, *F. concolor*, *F. proliferatum*, *F. incarnatum* and *F. solani* whose accession numbers in the National Center of Biotechnology Information are attached in this article. The species *F. ananatum*, *F. oxysporum* and *F. proliferatum* have been previously described as pathogenic in pineapple. The presence of *F. ananatum* in 95% of the collected fruit was related with the disease “fruitlet core rot”. *F. proliferatum* is a generator of mycotoxins, which could represent a danger to animal and human health. The other species have not been reported in pineapple before. **Conclusion.** The presence of the pathogen *F. guttiforme* was not found, although there were identified the species of this genus, present in pineapple cultivation area in Costa Rica.

INTRODUCCIÓN

La piña es nativa de Sur América y es uno de los cultivos tropicales más importantes en el mercado mundial. En Costa Rica durante el 2020, las exportaciones de banano (US \$ 1 080,8 millones), piña (US \$ 967,2 millones), jarabes y concentrados (US \$ 450,8 millones), café oro (US \$ 325,6 millones) y el aceite de palma (US \$ 131,5 millones) representaron el 59,0% de las ventas de bienes de origen agropecuario (Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria 2021). A partir de 1986 toma mayor importancia el cultivo de piña en Costa Rica, inicialmente con la exportación de fruta de la variedad Cayenna Lisa, luego la variedad Champaca, y a partir del 2001 y hasta la actualidad, la variedad comercial de más demanda en Estados Unidos y Europa

que es la Golden ripe o MD-2 (CANAPEP 2016). En el 2019 el área de cultivo fue de 40 000 hectáreas (ha) (Avendaño 2019), distribuidas en 16 cantones de 3 zonas principalmente. La zona Norte con un área de producción de 22 400 ha, el equivalente al 56% del área cultivada; la zona del Atlántico con 10 000 ha que representan el 25% y la zona del Pacífico que destina 7600 ha, lo cual constituye el 19%. La producción se encuentra en manos de alrededor de 250 productores de piña, en todo el país (CANAPEP 2016). El ciclo de producción de la piña es anual y desde la siembra de la semilla (plántula), tarda aproximadamente un año para la primera y al menos 10 meses para obtener la segunda cosecha (OIRSA 2011).

El cultivo de piña es altamente susceptible a diferentes plagas, parásitos y patógenos (OIRSA 2011). Entre estas, plagas como las

cochinillas *Dysmicoccus brevipes* (Vindas y Blanco 2013), parásitos como el nematodo *Pratylenchus* spp. (Gamboa 2019), y algunos patógenos como el complejo de virus de la marchitez de la piña (MWP, mealybug wilt of pineapple), *Phytophthora nicotianae* y *P. cinnamomi* (Ulate 2018), *Fusarium oxysporum* (Rojas 2020), y *Erwinia carotovora* y *E. chrysanthemi* que son los más comunes (Monge 2018). Una vez que las plantas de piña se ven afectadas por estos organismos es casi imposible obtener la calidad de la fruta exportable que exige el mercado internacional (CANAPEP 2016).

El género *Fusarium*, pertenece a la familia de los Ascomicetes y comprende los hongos fitopatógenos y saprófitos de mayor dispersión mundial. Este provoca síntomas como la pudrición de raíces (hipoxia o anoxia) o la formación de lesiones en la base de la planta, la marchitez vascular que conduce a una necrosis inicial de los tejidos, incluyendo hojas y brotes, y finalmente la muerte de toda la planta (Singleton y Sainsbury 2006, Retana *et al.* 2018). Para la clasificación de las especies de *Fusarium* se utilizan características fenotípicas junto con secuencias genéticas provenientes principalmente de genes como el factor de elongación 1a, RPB1 y 2, B-tubulina, y la subunidad de la región pequeña mitocondrial (mtSSU) (Aoki *et al.* 2014, O'Donnell *et al.* 1998). Estas regiones génicas han sido de gran utilidad para poder agrupar este género en 23 complejos de especies de *Fusarium*, que comprenden un total aproximado de 300 especies, de las cuales la mitad no ha sido formalmente descrita (O'Donnell *et al.* 2009 Summerell 2019).

El primer reporte de una enfermedad relacionada al género *Fusarium* en piña se dio en Argentina en 1954 y se le asignó el nombre de *F. subglutinans* (Wollenw. & Reinking), conocida comúnmente como fusariosis y como una de las enfermedades más agresivas. Diez años después, esta misma enfermedad se reportó en Brasil con pérdidas entre el 30% y el 80% (de Farias *et al.* 2010, Jacobs *et al.* 2010, OIRSA 2011). En 1993 Ventura *et al.* propusieron una nueva *forma especial* basada en la especificidad del hospedante

y lo llamaron *F. subglutinans* f. sp. *ananas*. En 1998 el mismo hongo fue nombrado por Nirenberg y O'Donnell como *F. guttiforme* y así se le conoce hasta el momento. Actualmente existen informes de la presencia en Hawaii, el continente asiático, el Caribe, Australia y en América del Sur: Brasil, Argentina, Venezuela y Bolivia (de Farias *et al.* 2010, Jacobs *et al.* 2010).

Actualmente, el ataque por *F. guttiforme*, es considerado como la mayor amenaza, debido a la susceptibilidad que presentan las principales variedades comerciales de piña para exportación en particular, el híbrido MD-2. Esta enfermedad produce una pudrición en el centro del fruto, afecta los rebrotos, la corona y la planta en general, además tiene la capacidad de permanecer en los residuos vegetales y lograr sobrevivir en retoños o hijos. Los síntomas van desde marchitez o muerte de los brotes apicales, rompimiento de la filotaxia, hasta atrofia y clorosis, que causan finalmente la muerte de la planta. También afecta el fruto, en el que se puede observar un exudado. Las esporas presentes en los tejidos infectados pueden contaminar y afectar la planta entera, fruta, corona e hijuelos y el patógeno subsiste en los retoños que son infectados al estar adheridos a la planta madre. Los cultivos sin atender son una importante fuente de inóculo. El inóculo una vez establecido se dispersa por viento, lluvia, insectos y material vegetativo (de Farias *et al.* 2010, Jacobs *et al.* 2010; OIRSA 2011, Rohrbach *et al.* 2003).

Otro patógeno de importancia en piña es la especie *F. ananatum*, conocido como el agente causal de la pudrición del centro del frutículo (fruitlet core rot, FCR). Esta es comúnmente conocida como la pudrición negra que afecta a los frutos de piña durante la maduración. Esta enfermedad fue inicialmente reportada en Australia a finales del siglo XIX y su sintomatología fue descrita como “la formación de marcas café oscuro de media a un cuarto de pulgada exactamente debajo de la cáscara y que no alcanzaban la parte central de la fruta” (Barral *et al.* 2020) y patógenos como *Fusarium verticilloides* (sin. *F. moniliforme*) y *Penicillium funiculosum* fueron

considerados por mucho tiempo como los agentes causales (Barral *et al.* 2017). En el 2010, esta sintomatología fue descrita por Jacobs *et al.* y por Gu *et al.* en el 2015 a partir de aislamientos provenientes de Sur África y China, respectivamente. *F. ananatum* presentaba diferencias en características a nivel molecular y morfológicas con respecto a los de *F. guttiforme*. Jacobs *et al.* (2010) describen los aislamientos localizados en Sur África como una nueva especie denominada *F. ananatum*, sin embargo, aún no ha sido agrupada oficialmente dentro de los complejos de especies de *Fusarium*. El patógeno penetra la planta durante los estados de la floración y puede permanecer latente mientras crece el fruto (Barral *et al.* 2017). Se cree que el patógeno se ve favorecido por temperaturas medias y alta humedad durante el desarrollo del fruto (Fournier *et al.* 2015) y el daño inicia con una necrosis en las brácteas, conforme pasa el tiempo avanza hacia una pudrición clara y suave, y luego termina con una pudrición oscura y seca, cerca de la cosecha. Es común que los síntomas no sean visibles externamente, lo que hace más difícil el diagnóstico de la enfermedad (Barral *et al.* 2017).

En Costa Rica durante la primera década del 2000 los productores de piña comenzaron a observar un amarillamiento en la punta de las hojas, el cual en muchos casos fue relacionado a *Phytophthora* spp. En años posteriores se reportó un incremento en el tamaño y el número de los parches y el “amarillón” (como se le conoce) se ha convertido en una preocupación. La enfermedad se caracteriza por un desecamiento de las hojas de la parte superior (ápice) hacia la base, donde luego se da la muerte descendente de las plantas infectadas. Las plantas presentan un amarillamiento, notable pérdida de vigor en la plantación y severas lesiones a nivel vascular, específicamente en el tallo. Si la enfermedad está avanzada, se presenta un desecamiento total en los primeros 10-18 centímetros de la hoja, luego el resto de las hojas toman un color amarillento

similar a los síntomas que en el medio piñero se le llama enfermedad del “virus del wilt”. Las plantas que presentan esta enfermedad pueden encontrarse en parches sintomáticos hasta en bloques completos de siembra. En el fruto, a simple vista, no se detecta ningún daño, únicamente la falta de crecimiento si la planta está muy afectada (Agricultores, comunicación personal).

En el 2014, Vásquez y Mata, reportaron la presencia de *F. oxysporum* asociado a varios síntomas descritos anteriormente, sin embargo, no se indica el número de muestras utilizadas para llegar a esta conclusión. Por otra parte, *Phytophthora cinnamomi* y *P. nicotianae* también han sido descritas por producir este tipo de síntomas (Ulate 2018).

En Costa Rica se le ha dado poca importancia a los problemas que producen las especies de *Fusarium* en campo y en poscosecha, y se han realizado pocos estudios relacionados a estos patógenos. El objetivo de este trabajo es determinar la presencia o ausencia del patógeno *Fusarium guttiforme*, e identificar y caracterizar las diferentes especies de este género, presentes en el cultivo de piña en las zonas Norte, Pacífico y Atlántica de Costa Rica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitios y recolecta del material. Las plantas de piña se recolectaron en las provincias de Heredia y Alajuela (Región Huetar Norte), Puntarenas (Región Pacífico Central), Limón (Región Huetar Atlántica) y San José (Región Brunca). Un total de 215 plantas sintomáticas completas (raíz y porción aérea) de la variedad MD2, se analizaron en el Laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigación en Protección de Cultivos (CIPROC). Un total de 20 frutos se analizaron en el Laboratorio de Tecnología Poscosecha del Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA), ambos de la Universidad de Costa Rica, entre 2015 y 2019 (Tabla 1).

Tabla 1. Plantas sintomáticas de piña recolectadas en diferentes localidades de Costa Rica entre 2015-2019.

Región	Provincia	Cantón	Distrito	Localidad	Año recolecta	# muestras
HUETAR NORTE	Heredia	Sarapiquí		Llano Grande	2015-2016	5
				Horquetas	2015-2016	3
				Puerto Viejo	2015-2016	2
				Pueblo Nuevo	2015-2016	1
	Alajuela	San Carlos	Pital	La Legua	2015-2016	22
					2017-2018	10
					2019	8
			San Luis	2015-2016	4	
				Veracruz	2015-2016	16
		Cutris	Cutris		2017-2018	5
				San Marcos	2015-2016	6
			Buena Vista	Buena Vista	2015-2016	6
				Los Chiles	2015-2016	12
		Los Chiles	Pavón		2016-2017	5
					El Carozo	2015-2016
HUETAR ATLÁNTICA	Limón	Pococí	Cariari		2015-2016	4
					2015-2016	5
			La Rita		2015-2016	1
			Guápiles		2017-2018	7
			Roxana		2019	8
			Guácimo		2015-2016	1
			Siquirres		2017-2018	7
PACÍFICO CENTRAL	Puntarenas	Sardinal			2017-2018	7
BRUNCA	San José	Pérez Zeledón	San Pedro		2017-2018	8
	SUBTOTAL				2015-2016	149
					2017-2018	50
					2019	16
	TOTAL					215

La recolección de material se hizo con la colaboración del personal del Servicio Fitosanitario del Estados (SFE) del Ministerio de Agricultura y Ganadería de Costa Rica. Esta consistió en la visita de fincas de piña de las regiones anteriormente nombradas y la recolección de únicamente plantas sintomáticas ubicadas en parches que presentaban síntomas característicos de la enfermedad “muerte descendente del cultivo de piña”. Cada planta y fruto fue transportado en sacos sin exceder 24 horas después de extraídas del campo. Las plantas tenían intactas las siguientes partes: raíz, tallo, hojas y fruto, en los casos en que estaba presente.

Caracterización de síntomas, aislamiento e identificación de agente causal. Los síntomas se caracterizaron visualmente, especialmente color, tamaño de la planta, daño interno a nivel de planta y fruto, y el estado de la raíz y se tomaron fotografías de cada síntoma de interés con una cámara Canon SX160IS.

A partir de la zona de avance de los síntomas más evidentes se realizaron cortes de tejido en las plantas (French y Hebert 1980). Cada trozo del tejido se desinfectó con etanol al 70% e hipoclorito de sodio al 1% durante 50 y 20 segundos respectivamente y se realizaron 3 lavados con agua estéril. De cada planta se hicieron al menos 4 platos de cultivo, cada uno con 5 segmentos de tejido sintomático. Cada plato contenía medio PDA (agar de dextrosa y papa) (Difco) al 1,5%, acidificado con ácido láctico (0,1%) y conservados a 22°C en una cámara de incubación marca Thermo Scientific, por un periodo de 8 días. Los aislamientos con presencia de *Fusarium* spp. se transfirieron a medio agar-hojas de clavel (CLA por sus siglas en inglés, Carnation Leaf Agar) (Leslie y Summerell 2006) para facilitar el desarrollo de macro y microconidios. El micelio de cada aislamiento fue conservado en discos de papel filtro que se almacenaron a una temperatura de -80°C por tiempo ilimitado.

Para los aislamientos a partir de los frutos, discos de 1,9 cm de diámetro de la cáscara (zona del tercio inferior), y de la zona del corte

del pedúnculo se colocaron en 40 ml de agua destilada con una gota del dispersante Tween 80. Se colocaron en agitación por 5 minutos, se realizó una dilución de la suspensión (0,1 ml de la muestra se combinó con 0,9 ml de agua destilada estéril), se agitó nuevamente para luego tomar una alícuota de 0,1 ml y con ayuda de un asa Drigalski se distribuyó sobre una placa de Petri con medio PDA acidificado. Tres repeticiones de cada muestra se colocaron en incubación a 22°C. Posteriormente, se reaislaron para obtener aislamientos más puros.

Se verificó la apariencia y coloración del micelio mediante la observación en un estereoscopio Motic SMZ-168 (Hong Kong, China). Los aislamientos encontrados en mayor frecuencia se les realizó la identificación molecular.

Posteriormente y por medio del microscopio de luz, Olympus modelo BX41BF (Tokio, Japón) con un lente de aumento de 40X, se describieron los caracteres morfológicos para cada uno de los cultivos axénicos de *Fusarium* spp. de acuerdo con su identificación por medios moleculares. Se tomó en cuenta el tamaño y la forma de los macroconidios así como el tamaño, la presencia o la ausencia de microconidios, la formación de clamidosporas y la forma de las estructuras de los conidióforos (Summerell *et al.* 2003, Leslie y Summerell 2006, Summerell 2019).

Para preparar aislamientos puros para los procesos moleculares, se colocó un trozo pequeño de micelio de aproximadamente 5 mm² en platos con medio de cultivo PDA. También se implementó la metodología a partir de una sola espora, una punta de hifa o la limpieza de los aislamientos con aplicación de antibióticos.

Extracción de ADN, PCR y electroforesis. El análisis molecular se llevó a cabo en el Laboratorio de Técnicas Moleculares aplicadas a la Fitoprotección del CIPROC. Se extrajo ADN a partir de micelio fresco de aislamientos monospóricos y/o puros del hongo, con el método CTAB (Murray y Thompson 1985). Este se cuantificó mediante el espectofotómetro

BioPhotometer Plus 6132 (Eppendorf, Hamburg, Alemania) y se llevó a una concentración final de 80 ng.uL⁻¹. La amplificación del ADN se llevó a cabo con los marcadores moleculares para la región del ITS del ADN ribosomal: ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') y el ITS5 (5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAGG-3') descritos por White *et al.* (1990) y el factor de elongación alfa (TEF-1 α): EF1 (5'-ATGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC-3') y EF2 (5'-GGA(G/A)GTACCAGT(G/CATCAT-GTT-3') para la identificación y caracterización específica de especies de *Fusarium* (O'Donnell *et al.* 1998, Geiser *et al.* 2004).

La reacción de amplificación y el perfil térmico se realizaron por medio de un estándar (Blanco-Meneses y Ristaino 2011). Los productos de amplificación se separaron en un gel de agarosa al 0,8% con GelRed (Biotium) a 0,5 μ g.mL⁻¹ para la tinción y buffer TBE 0.5%, y se compararon con un marcador de peso molecular de 100bp (Thermo Scientific). La presencia de bandas se visualizó con luz ultravioleta.

Secuenciación e identificación de los aislamientos. Un total de 120 productos de PCR se purificaron con la enzima Exonuclease I (Fermentas, Massachusetts, USA) y se llevaron a una concentración de 50 ng μ L⁻¹. Se utilizó secuenciación de Sanger (Sanger *et al.* 1977) en la empresa Macrogen Inc., Corea del Sur. La calidad de las secuencias se confirmó con un alineamiento bidireccional y por comparación con los cromatogramas mediante el programa BioEdit Sequence Alignment Editor Versión 7.0.5.3 (Hall 1999). La hebra consenso se utilizó para verificar la similitud en buscadores como Nucleotide Blast del Gen Bank (Clark *et al.* 2016), EPPO-Q-bank y MycoBank, entre otros, con el empleo de la colección de nucleótidos y la opción de “material tipo” de ser posible (Federhen 2015).

RESULTADOS

Recolección y caracterización del material. El presente estudio tuvo una duración de 5

años, en los cuales se recolectó un total de 215 muestras en diferentes regiones de Costa Rica. Se recolectó 149 plantas y 20 frutos entre 2015-2016, 50 plantas entre el 2017-2018 y 16 plantas en el 2019 (Tabla 1). Según datos del Servicio Fitosanitario del Estado se cubrió un total de 38 175 ha (95%) del área sembrada de piña, que comprendían 4 provincias, 6 cantones y 18 distritos del país. Se realizó un muestreo dirigido para encontrar parches sintomáticos y relacionados a los síntomas de “muerte descendente del cultivo de piña”.

La recolección de plantas enfermas a nivel de campo, se centró en síntomas ligados a desecamiento de las hojas, pérdida de vigor de la plantación y lesiones severas a nivel vascular, específicamente en el tallo, distribuidas en forma de parches de unas cuantas plantas y en otros casos en bloques completos de siembra. El síntoma más característico fue una muerte descendente de las plantas infectadas, las cuales presentaron un amarillamiento, observándose un desecamiento de las hojas de la parte superior (ápice) hacia la base. Cuando la enfermedad estaba avanzada, se presentó un desecamiento total o necrosis en los primeros 15 cm de las hojas intermedias seguido de pérdida de coloración y turgencia en el resto de las hojas. Del material, se obtuvieron un total de 275 fotos de los síntomas de interés, agrupadas por año, procedencia, descripción de síntomas y resultados de los análisis realizados.

Cada una de las plantas y frutos se analizaron en los laboratorios. La mayoría de las plantas presentaban decoloración amarillenta en las hojas (Figura 1a). Al cortar el tallo longitudinal y transversalmente, se encontró que algunos de los haces vasculares tenían una coloración café de tipo necrótica (Figura 1b y c). En estados avanzados se observó un daño que alcanzaba la mayoría del tallo, además de un tejido translúcido y acuoso pero duro al tacto (Figura 1d y e). El desarrollo radical observado en las muestras analizadas, fue normal en la mayoría de los casos, sin embargo, ocurría descortezamiento de

las raíces en general (Figura 1f). En un 10% de las muestras de fruto no se observaron síntomas (Figura 1g), mientras que en el resto, fueron leves incluso la necrosis y corchosis en los

alrededores de algunos frutícolas. Los síntomas severos se manifestaron como una apariencia bronceada del fruto, restos florales secos y corchosis en frutícolas.

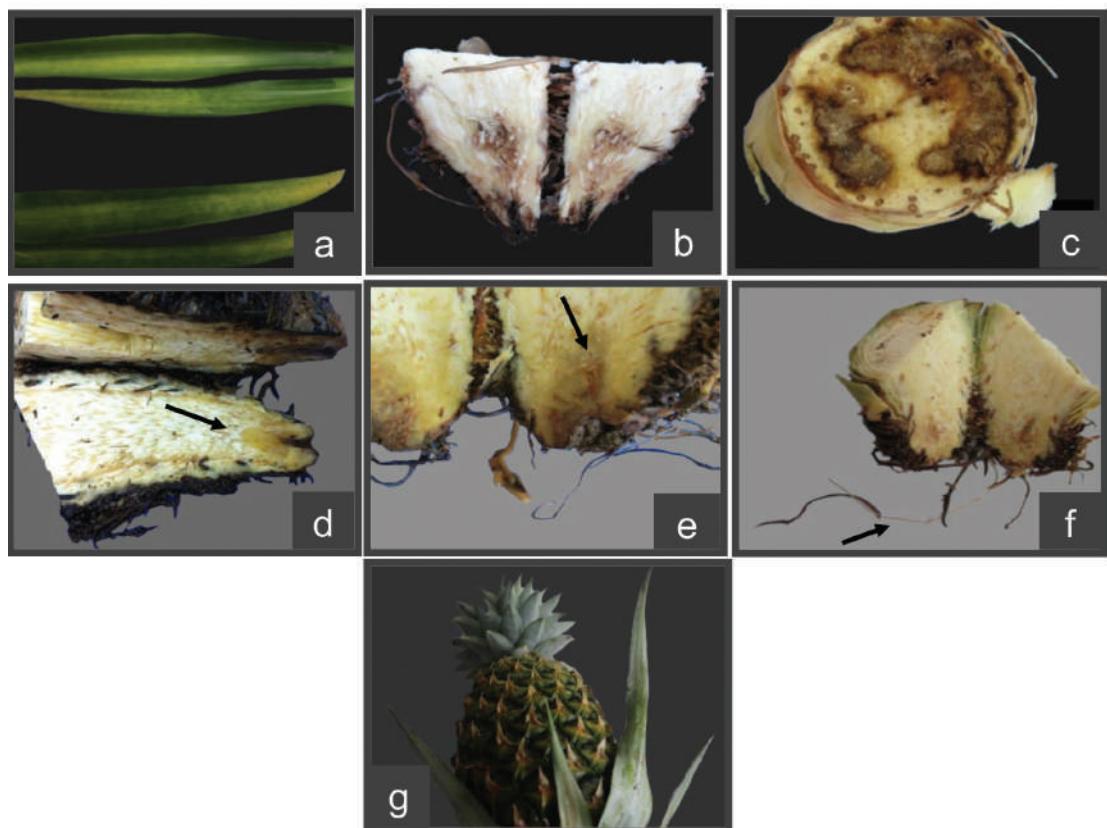


Figura 1. Síntomas asociados a la presencia de *Fusarium* spp. en plantas de piña. a) amarillamiento en hojas, b) necrosis en tallos al cortar longitudinalmente, c) necrosis en tallo al cortar transversalmente, d y e) tejido translúcido y acuoso, f) raíces con descortezaamiento general, g) frutos asintomáticos. Costa Rica 2015-2019.

Posterior a la identificación de los síntomas, se obtuvo un total de 608 platos de cultivo con porciones de tejido provenientes de síntomas relacionados a *Fusarium* spp. Se agruparon y luego se seleccionaron aquellos que por color y forma del micelio estaban en mayor frecuencia; posteriormente para favorecer la calidad y pureza, se reaislaron un total de 160 aislamientos en medios CLA y en PDA.

Durante 2015-2016 se obtuvo un total de 149 plantas de piña y 20 frutos provenientes de campo. Se analizó un total de 394 platos de cultivo con porciones de tejido provenientes de la base del tallo, raíces internas y externas, follaje, hijos; y del fruto, la cáscara y el pedúnculo. De los aislamientos realizados a partir del tejido de plantas y frutos, en un 63% creció al menos una especie relacionada al género

Fusarium, en el 37% restante se obtuvo en su mayoría bacterias y algunos pocos aislamientos relacionados a otros hongos. De los aislamientos recuperados del fruto, un 95% correspondieron con *Fusarium* spp.

En 2017-2018 se volvió a recolectar material de un total de 50 plantas para las cuales se realizó un total de 150 platos de cultivo, cada uno con 5 porciones de tejido provenientes de diferentes partes de tejido sintomático. En un 31% no hubo crecimiento de microorganismos, en un 27% creció *Pythium* spp. o *Phytophthora* spp., en un 24% se observó *Fusarium* y en un 18% hubo únicamente crecimiento de bacterias.

En el 2019, a partir de 16 plantas recolectadas se realizaron aislamientos en un total de 64 platos de cultivo. Se obtuvo un total de 55,5% del total de los aislamientos relacionados a especies *Fusarium* y en un 11,2% solo hubo crecimiento de bacterias o no hubo crecimiento de microorganismos.

Caracterización molecular de los hongos encontrados en piña. A partir de las 2

regiones genéticas analizadas, se encontró que la región ITS no permitía diferenciar entre las especies de *F. guttiforme* y *F. ananatum*, lo cual inicialmente constituía el objetivo principal de la investigación. Se utilizó para la identificación el factor de elongación 1 alpha que permitió diferenciar entre especies del género *Fusarium*. A partir de aislamientos monospóricos o puros se identificaron 6 especies de *Fusarium* en el material aislado a partir de partes de la planta y fruto del cultivo de piña, *F. ananatum*, *F. oxysporum*, *F. polypähladicum* conocido actualmente como *F. concolor* (nombre que se utilizará para efectos de este artículo), *F. proliferatum*, *F. incarnatum* y *F. solani*.

Para la identificación, se compararon las secuencias con similares reportadas en GenBank y relacionadas a artículos científicos del cultivo de piña, en otros casos a la secuencia más cercana. Se ingresó en el NCBI, Bankit una secuencia de cada especie para su clasificación y se les asignó un número de accesión (Tabla 2).

Tabla 2. Aislamientos secuenciados y comparados en NCBI y a los cuales se les asignó un número de accesión como especies ligadas a piña en Costa Rica. Costa Rica 2015-2019.

Aislamiento/ ADN ¹	Tejido procedencia ²	Nº accesión asignado ³	Gen	Bases analizadas	Especie más cercana	Nº accesión	Similitud (%)	Hospedante reportado
0034Bc	base, tallo, raíz, follaje, fruto, cáscara	OK143505	Tef-la	686	<i>Fusarium ananatum</i>	MT010996.1	100	piña
0027BA-0029B2B	base, tallo, raíz, follaje	OK143503, OK143504	Tef-la	693	<i>Fusarium oxysporum</i>	MN386725.1	100	ornamentales
0017B1B	base, tallo	OK143502	Tef-la	713	<i>Fusarium solani</i>	KM096403.1	99,58	suelo de manglar
FUS1	follaje, fruto, cáscara	OK143506	Tef-la	641	<i>Fusarium concolor</i>	GB425229.1	98,28	vainilla
0004-2FA	follaje, primordio	OK143501	Tef-la	690	<i>Fusarium proliferatum</i>	KU872097.1	100	pasto
3069	fruto, cáscara	OK143507	Tef-la	694	<i>Fusarium incarnatum</i>	MK049899.1	99,86	ornamentales

¹ Asignado de acuerdo con el número de recolección del material de campo.

² Tejidos de la planta y del fruto de los cuales se aisló esta especie.

³ Número de accesión asignado por el NCBI para aislamientos de este estudio.

Durante 2015-2016 se identificó un 1,16% de aislamientos de las especies *F. solani*, *F. incarnatum* y *F. proliferatum*, 6,9% de aislamientos de *F. concolor*, 13,8% de aislamientos de *F. oxysporum* y 71,6% de aislamientos de *F. ananatum*. Del total de los 116 aislamientos, 19 provenían del fruto de la piña y 18 de los mismos se identificaron como *F. ananatum*.

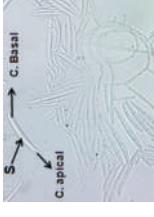
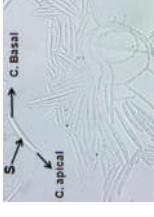
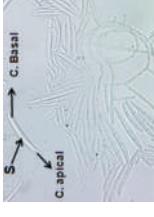
En 2017-2018 en el material que se secuenció relacionado a *Fusarium*, un 22% fue *F. oxysporum* y un 2% correspondió con *F. ananatum*.

En el 2019 los resultados correspondieron a un 55,5% del total de los aislamientos de

F. ananatum, un 22,2% de *F. oxysporum* y en un 11,1% de *F. solani*.

Caracterización morfológica de los hongos encontrados en piña. Una vez identificadas por medios moleculares las 3 especies patogénicas más frecuentes dentro del género *Fusarium* de acuerdo con los postulados de Koch (Díaz 2018), fueron descritas morfológicamente con algunas características macroscópicas y microscópicas propias para clasificar el género (Tabla 3).

Tabla 3. Caracterización morfológica de las 3 especies de *Fusarium* reportadas como patógenicas en piña recolectadas en diferentes localidades de Costa Rica entre 2015-2019.

Especie	Micelio (PDA)	Macroconidios	Microconidios	Clamidosporas	Células conidiogénas
<i>Fusarium ananatum</i>					
<i>Fusarium oxysporum</i>					
<i>Fusarium solani</i>					

Las colonias correspondientes a *F. ananatum* en medio PDA, presentaban un color que varió entre naranja (ladrillo) a tonos rosados, con anillos concéntricos y un crecimiento aéreo leve en el centro de la misma. Los macroconidios eran cortos con 1 a 3 septos, relativamente rectos (sin curvaturas), con una célula apical aguda y una célula basal redondeada; los microconidios ovoides sin septos. Estos conidios se presentaban unidos a los conidióforos en forma de falsas cabezas. Las células conidiógenas se observaron como monofláldes simples cortas, con escasas clamidosporas solitarias terminales (Cl) (Tabla 3).

En el caso de *F. oxysporum* la coloración del micelio fue blanca o lila en el medio de cultivo PDA. Los macroconidios falcados con 3 a 5 septos, con una célula apical aguda y una célula basal en forma de pie y los microconidios ovoides sin septos. Las clamidosporas abundantes y se encontraron de forma solitaria, terminales e intercalares. Las células conidiógenas se mostraron como monofláldes simples cortas (Tabla 3).

F. solani desarrolló una coloración rojiza en el micelio aéreo al crecer en el medio de cultivo PDA. Los macroconidios eran angostos, casi rectos con 3 a 7 septos, con una célula apical aguda y una célula basal en forma de pie. Las células conidiógenas se observaron como monofláldes largas y las clamidosporas terminales, solitarias y en pares (Tabla 3).

En varios aislamientos fue posible observar la presencia de dos especies de *Fusarium* que convivían en la misma lesión.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El cultivo de piña en Costa Rica es importante a nivel económico para el ingreso de divisas y como actividad que provee trabajo a un alto porcentaje de la población del país, sin embargo, la aparición de enfermedades dificulta el manejo del cultivo e incrementa los costos de producción. El objetivo principal de esta investigación fue verificar la presencia o ausencia del patógeno *F. guttiforme* en plantaciones de piña ubicadas en

Costa Rica y las especies presentes en el cultivo. Primero, se logró determinar la ausencia en el país de *F. guttiforme* por medio de técnicas moleculares. Segundo, se pudo identificar la presencia de 6 especies de *Fusarium* relacionadas al cultivo de piña, algunas especies reportadas como patogénicas en este y otros cultivos. Finalmente, las especies encontradas fueron caracterizadas a nivel morfológico y molecular, a partir de los aislamientos generados.

A partir de porciones de tejido provenientes de plantas sintomáticas relacionadas a “la muerte descendente en piña” se identificaron 6 especies: *Fusarium ananatum*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. incarnatum*, *F. concolor* y *F. proliferatum*. Además de la presencia de *Fusarium* se pudo identificar la presencia de otros patógenos como *Pythium* spp. o *Phytophthora* spp., y múltiples microorganismos como *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp., bacterias y levaduras. Esto permite concluir que dentro de cualquier planta o cultivo existe una serie de microorganismos que interactúan durante el desarrollo del mismo; algunos organismos endógenos que se relacionan con la planta sin causar aparente sintomatología y otros previamente reportados como patógenos que podrían ocasionar síntomas, bajo las condiciones adecuadas (Castro y Umaña 2017, Fritiani *et al.* 2020).

En este estudio no fue posible diferenciar las 6 especies con base en la sintomatología que se observó en las plantas, ya que era común encontrar el mismo tipo de daño. La presencia de las diferentes especies podría ligarse a condiciones climáticas favorables para el desarrollo del patógeno, a la diversidad de cultivos presentes en las zonas previo a la siembra del cultivo de piña, y no se descarta factores como prácticas y tecnologías utilizadas para el manejo del cultivo.

En el fruto, se identificó la presencia de *F. ananatum* en un 95% de los aislamientos realizados a partir de porciones de la cáscara del fruto y el corte del pedúnculo provenientes de plantas enfermas, aunque en algunas ocasiones sin síntomas visibles. Debido a que el fruto es el producto comercializado para este cultivo es

necesario realizar más estudios sobre el daño que podría ocasionar este patógeno. En este estudio, se reporta que la especie *F. ananatum* es el agente causal de la pudrición del centro del frutículo, PCF (fruitlet core rot, FCR) en plantas de piña de Costa Rica, encontrándose el hongo no solo en el fruto sino en aislamientos provenientes de hojas, tallo y raíz.

F. ananatum causa un daño interno, considerándose aproximadamente 12 días lo requerido, luego de la llegada del inóculo a la planta, para causar las mayores lesiones en el fruto (Barral *et al.* 2017), sin embargo, el mismo no se logra apreciar desde la parte externa del fruto. A pesar de que se reporta la dispersión de este patógeno por medio de esporas de forma aérea, durante la maduración del fruto, Jacobs *et al.* 2010 afirman que este no cuenta con toxinas que le permitan entrar y degradar las partes externas, más gruesas, del fruto de piña. En investigaciones posteriores, se encontró que la infección ocurre durante el desarrollo de la inflorescencia, el patógeno permanece latente por un tiempo y durante la maduración del fruto, y así *F. ananatum* inicia con el desarrollo de los síntomas (Barral *et al.* 2017), lo que se ve favorecido por temperaturas medias y una alta humedad en el ambiente (Fournier *et al.* 2015). Conforme el fruto alcanza la maduración, los síntomas de necrosis en las brácteas del fruto aumentan e incluso pueden darse síntomas de corchosis o formación de manchas “bolsillo de cuero” (Rohrbach *et al.* 2003), en otros casos la presencia de este patógeno se ha asociado a la permanencia del fruto en un estado verde y que no se torna amarillo con la maduración, lo cual se ha denominado “fruto verde” (Pires de Matos 2019). Usualmente los síntomas no son visibles a nivel externo en el fruto, esto hace que esta enfermedad sea más difícil de detectar por parte de los productores y los consumidores de piña. La agresividad de *F. ananatum* también depende de la variedad de piña utilizada, cultivares como “Queen” se consideran altamente susceptibles, el “Smooth Cayenne” es considerado

moderadamente susceptible, mientras que en el “MD2”, es menos frecuente al desarrollo de los síntomas en el tejido, aunque el patógeno esté presente. En Costa Rica la variedad MD2 es la de mayor producción. Barral *et al.* 2019 relacionan esta resistencia directamente a la estructura floral donde el tejido es más compacto en cultivares como MD2, mientras que en variedades como Queen existen muchos espacios libres que permiten el crecimiento de estructuras del hongo. A la vez, la aparición de paredes lignificadas por la producción de ácidos fenólicos en altas cantidades funciona como un mecanismo de defensa preventivo para la colonización del hongo (Barral *et al.* 2019, Barral *et al.* 2020).

La infección en plantas de piña con *F. ananatum* se ha asociado a la presencia del vector *Steneotarsonemus ananas*. Este infecta las flores abiertas aunque también logra penetrar a través del tejido del fruto por la presencia de heridas (Pires de Matos 2019). Este ácaro ya fue descrito en Costa Rica en el 2012 por Aguilar y Murillo. La presencia de un vector hace aún más difícil el manejo de la PCF y es necesario el uso de pesticidas para reducir las poblaciones del ácaro. Esto representa agregar más químicos, en un cultivo como la piña, en el cual la aplicación de agroquímicos y fertilizantes es intensiva. La investigación para encontrar posibles controladores biológicos del ácaro sería un tema prioritario a considerar.

Jacobs *et al.* 2010 describen los aislamientos de *F. ananatum* localizados en Sur África como una nueva especie de *Fusarium* y se diferencia de otras especies por sus secuencias de ADN mediante las regiones de la Histona H3, de la β -tubulina (BT), de los genes del factor de elongación 1 α (TEF) y también de acuerdo con sus características morfológicas. En los aislamientos provenientes de Costa Rica, la morfología lo define con presencia de conidióforos de naturaleza erecta en el micelio aéreo y la distribución de micelio aéreo en la superficie de los aislamientos, especialmente en el centro del aislamiento. A la vez, se pueden observar círculos concéntricos de crecimiento de micelio y un

característico color “ladrillo” de las colonias en medio PDA. En el fruto los síntomas asociados tanto a *F. guttiforme* y a *F. ananatum* son muy similares, pero son menos severos en el último de los 2 hongos. En *F. guttiforme* se da una decoloración en el fruto, sin embargo, en la parte infectada se observa una lesión en forma de V (uve) que al inicio no tiene color, pero luego se torna acuosa (Jacobs *et al.* 2010). A pesar de que *F. ananatum* parece tener una aparente menor agresividad es un organismo que está presente en Costa Rica y al cual hay que darle un seguimiento cercano.

El segundo organismo más común en este estudio fue *F. oxysporum* f. sp. *ananas*, que ha sido el patógeno reportado como causante del daño en plantas de piña en Costa Rica en años anteriores. Este, se caracteriza por una muerte regresiva en la planta, desecamiento de las hojas, notable pérdida de vigor de la plantación y severas lesiones a nivel vascular, específicamente en el tallo (Rojas 2020, Vázquez y Mata 2014, Vásquez-Jiménez 2009). En Brasil esta especie actúa simultáneamente con *F. ananatum* y *F. guttiforme*. Su ingreso se da por la raíz y puede mantenerse en suelo por largos períodos de tiempo. También se ha reportado en la variedad Cayena Lisa en Perú y se ha relacionado a clorosis, enrojecimiento progresivo de las hojas basales hacia las hojas superiores, muerte regresiva de la planta, encarrujamiento de puntas y necrosis, frutos pequeños atrofiados, cloróticos y volcamiento de los frutos por encorcharamiento de los pedúnculos (Rojas 2020). Esta ha sido caracterizada tanto a nivel morfológico como molecular en varios estudios (Rojas 2020, Vázquez y Mata 2014, Vásquez-Jiménez 2009).

F. proliferatum fue recuperado e identificado como causante del moho en el corte del pedúnculo de piña, y se ha encontrado en el análisis de otras muestras de frutos de piña, así como en diferentes fases del proceso poscosecha (Castro y Umaña 2015, Castro y Umaña 2017). Además, se le ha relacionado a patologías observadas en Malasia con pudrición de fruto y de tejidos de la planta (Ibrahim *et al.* 2017, Ibrahim

et al. 2020). La habilidad de este patógeno de producir micotoxinas ha sido analizada mediante el gen FUM1, que actúa como indicador de la presencia de la fumonisina B₁ (FB₁) así como por medio de cromatografía donde se estudió la presencia de moniliformina (MON) y beauvericina (BEA). Este patógeno es capaz de producir fumonicinas, las cuales junto con tricotecenos y zearalenona, son de las micotoxinas más peligrosas para la salud animal y humana (Barral *et al.* 2020, Ibrahim *et al.* 2020).

Estudios en el fruto han indicado la presencia de micotoxinas además de un incremento en la producción de fenoles, ácidos coumaroylisocítrico y cafeoyl-isocítrico ante la presencia de especies de *Fusarium*. Se ha encontrado concentraciones altas de micotoxinas ante la inoculación con *F. ananatum* y *F. proliferatum* al comparar con frutos no inoculados, especialmente las fumonisinas B1 y B2. Además, se encontró que *F. oxysporum* es capaz de producir beauvericina (Barral *et al.* 2017, Barral *et al.* 2020). Esto podría representar un riesgo para la salud humana a la hora de ser consumido el fruto, por lo que se recomienda realizar un estudio más exhaustivo al respecto.

Otras especies como *F. concolor*, *F. incarnatum* y *F. solani* no han sido descritas como patógenos de piña hasta el momento.

Con este estudio se pudo constatar que el patógeno *F. guttiforme* aun no está presente en el cultivo de piña en Costa Rica, además se logró identificar las especies de *Fusarium* que interactuaban en el cultivo de la piña. En este trabajo se presenta un estudio preliminar que sugiere investigación más profunda en aspectos como: la interacción del cultivo de piña con otras especies patogénicas y no patogénicas, la presencia de especies productoras de micotoxinas, la interacción de *Fusarium* y vectores transmisores de enfermedades y el efecto de la PCF en las variedades de piña cultivadas en el país, entre otros. Esto llevará a establecer un mejor manejo del cultivo y favorecer prácticas que mejoren la calidad de la fruta y por ende un consumo más sano.

AGRADECIMIENTO

Un especial agradecimiento al personal del Servicio Fitosanitario del Estado, MAG, por la recolección de material. A los productores de piña por facilitar la toma de las muestras de plantas sintomáticas para los análisis morfológicos y moleculares. A la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica por facilitar esta investigación como parte del proyecto 813-B4-230.

LITERATURA CITADA

- Aguilar, H; Murillo, P. 2012. Nuevos hospederos y registros de ácaros fitopatógenos para Costa Rica: Período 2008-2012. *Agronomía Costarricense* 36(2):11-28.
- Aoki, T; O'Donnell, K; Geiser, D. 2014. Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. *Journal of General Plant Pathology* 80:189-201. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10327-014-0509-3>.
- Avendaño, M. 2019. Clima y exceso de oferta golpean fuerte a cultivos de exportación (en línea). San José, Costa Rica, El Financiero. Consultado ago. 2021. Disponible en <https://www.pressreader.com/costa-rica/el-financiero-costa-rica/20190713/281754155895459>
- Barral, B; Chillet, M; Doizy, A; Grassi, M; Ragot, L; Lechaudel, M; Durand, N; Rose, L; Viljoen, A; Schorr-Galindo, S. 2020. Diversity and Toxicogenicity of Fungi that Cause Pineapple Fruitlet Core Rot. *Toxins* 12:339. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins12050339>.
- Barral, B; Chillet, M; Lechaudel, M; Lartaud, M; Verdeil, JL; Conejero, G; Schorr-Galindo, S. 2019. An Imaging Approach to Identify Mechanisms of Resistance to Pineapple Fruitlet Core Rot. *Frontiers in Plant Science* 10:1065. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01065>.
- Barral, B; Chillet, M; Minier, J; Lechaudel, M; Schorr-Galindo, S. 2017. Evaluating the response to *Fusarium ananatum* inoculation and antifungal activity of phenolic acids in pineapple. *Fungal Biology* 121:1045-1053. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.09.002>.
- Blanco-Meneses, M; Ristaino, J. 2011. Detection and quantification of *Peronospora tabacina* using a Real-time Polymerase Chain Reaction assay. *Plant Disease* 95(6):673-682. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-10-0333>.
- CANAPEP. 2016. Cámara Nacional de Productores y Exportadores de piña (en línea). San José, Costa Rica. Consultado ago. 2021. Disponible en <https://canapep.com>
- Castro, J; Umaña, G. 2015. Poblaciones e identificación de los hongos causantes de mohos poscosecha en el pedúnculo de la piña, en dos zonas de Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 39(3):61-77. DOI: <https://doi.org/10.15517/RAC.V39I3.21792>.
- Castro, J; Umaña, G. 2017. Frecuencia de los hongos asociados al desarrollo de mohos poscosecha en el pedúnculo de la piña en dos zonas de Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 41(2):17-25. DOI: <https://doi.org/10.15517/RAC.V41I2.31296>.
- Clark, K; Karsch-Mizrachi, I; Lipman, DJ; Ostell, J; Sayers, EW. 2016. GenBank. *Nucleic Acids Research* 44(1):67-72. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1276>.
- De Farias, GM; Belisario, P; Shaun, D; Ventura, J; Machado, P; Ribeiro, A. 2010. Cell wall alterations in the leaves of fusariosis-resistant and susceptible pineapple cultivars. *Plant Cell Reports* 29:1109-1117. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0894-9>.
- Díaz, G. 2018. Patogenicidad de diferentes aislamientos de *Fusarium* spp. y su efecto sobre la calidad en piña (*Ananas comosus*) en poscosecha. Tesis Lic. San José, Costa Rica Universidad de Costa Rica. 60 p.
- Federhen, S. 2015. Type material in the NCBI Taxonomy Database. *Nucleic Acids Research* 43(D1):D1086-D1098. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gku1127>.
- Fitriani, R; Putrie, W; Aryantha, N; Prayogo, I; Antonius, S. 2020. Diversity of endophytic and rhizosphere bacteria from pineapple (*Ananas comosus*) plant in semi-arid ecosystem. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity* 21:3084-3093. DOI: <http://www.doi.org/10.13057/biodiv/d210728>.
- Fournier, P; Benneveau, A; Hardy, C; Chillet, M; Lechaudel, M. 2015. A predictive model based on a pluviothermic index for leathery pocket and fruitlet core rot of pineapple cv. 'Queen'. *European Journal of Plant Pathology* 142:449-460. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0625-8>.
- French, E; Hebert, T. 1980. Métodos de investigación fitopatólogica. San José, Costa Rica, Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas IICA. 288 p.
- Gamboa, E. 2019. Identificación taxonómica y molecular de especies del nematodo lesionador de la raíz *Pratylenchus* spp. (Nematoda: Pratylenchidae) asociado a cuatro cultivos de Costa Rica. Tesis Lic. Heredia, Costa Rica, Universidad Nacional. 80 p.
- Geiser, DM; Jiménez-Gasco, MM; Kang, S; Makalowska, I; Veeraraghavan, N; Ward, TJ; Zhang, N; Kulda, GA; O'Donnell, K. 2004. FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology* 110:473-479. DOI: <https://doi.org/10.1023/B:EJPP.0000032386.75915.a0>.

- Gu, H; Zhang R; Zhang, L; Gong, Q; Jia, Z. 2015. First report of *Fusarium ananatum* causing pineapple fruitlet core rot in China. Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences 99(11):1653. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-15-0279-PDN>.
- Hall, TA. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequences alignment editor and analysis program for Windows. Nucleic Acids Symposium Series 41:95-98.
- Ibrahim, NF; Mohd, MH; Izham, NM; Nor, M; Zakaria, M. 2017. Characterization of *Fusarium* spp. associated with pineapple fruit rot and leaf spot in Peninsular Malaysia. Journal of Phytopathology 165:718-726. DOI: <https://doi.org/10.1111/jph.12611>.
- Ibrahim, NF; Mohd, MH; Izham, NM; Nor, M; Zakaria, M. 2020. Mycotoxicogenic potential of *Fusarium* species associated with pineapple diseases. Archives of Phytopathology and Plant Protection 53:5-6. DOI: <https://doi.org/10.1080/03235408.2020.1736971>.
- Jacobs, A; Schalk, V; Marasas, O; Wingfield, B; Wingfield, M; Coutinho, T. 2010. *Fusarium ananatum* sp. in the *Gibberella fujikuroi* complex from pineapples with fruit rot in South Africa. Fungal Biology 114:515-527. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2010.03.013>.
- Leslie, JF; Summerell, BA. 2006. The Fusarium Laboratory Manual. Iowa, USA, Wiley-Blackwell. 388 p.
- Monge, M. 2018. Guía para la identificación de la principales plagas y enfermedades en el cultivo de piña (en línea). San José, Costa Rica. Consultado ago. 2021. Disponible en http://cica.ucr.ac.cr/wp-content/uploads/2020/11/Manual-de-plagas-Pi%C3%BCa-CICA-08-10-20191_compressed.pdf
- Murray, MG; Thompson, WF. 1985. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research 8(19):4321-4325. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/8.19.4321>.
- Nirenberg, HI; O'Donnell, K. 1998. New *Fusarium* Species and Combinations within the *Gibberella fujikuroi* Species Complex. Mycologia 90(3):434-458. DOI: <https://doi.org/10.2307/3761403>.
- OIRSA. 2011. Fusariosis de la piña: *Fusarium guttiforme*. Reglamentación Fitosanitaria para la importación, Normas Regionales en Sanidad Vegetal, Directrices para la protección contra *Fusarium guttiforme* (en línea). San Salvador, El Salvador. Consultado ago. 2021. Disponible en <https://www.oirsa.org/informacion.aspx?id=85>
- O'Donnell, K; Kistler, HC; Cigelnik, E; Ploetz, R. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95:2044-2049. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.95.5.2044>.
- O'Donnell, K; Sutton, DA; Rinaldi, MG; Gueidan, C; Crous, PW; Geiser, DM. 2009. Novel multilocus sequence typing scheme reveals high genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium incarnatum*-*F. equiseti* and *F. chlamydosporum* species complexes within the United States. Journal of Clinical Microbiology 47(12):3851-3861. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.01616-09>.
- Pires de Matos, A. 2019. Main pests affecting pineapple plantations and their impact on crop development. Acta Horticulturae 1239:137-146. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2019.1239.17>.
- Retana, K; Ramírez-Coché, J; Castro, O; Blanco-Meneses, M. 2018. Caracterización morfológica y molecular de *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii* asociado a la marchitez del apio en Costa Rica. Agronomía Costarricense 42(1):115-126. DOI: <http://dx.doi.org/10.15517/rac.v42i1.32199>.
- Rohrbach, KG; Leal, F; Coppens, G. 2003. The pineapple botany, production and uses. In Bartholomew, D; Paull, R; Rohrbach, K (eds.). History, Distribution and World Production. New York, USA, CAB International. p. 1-10.
- Rojas, JE. 2020. Aislamiento, patogenicidad y caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* Schltl, que afecta piña (*Ananas comosus*) en Poroto, La Libertad. Tesis M.Sc. Perú, Universidad Nacional de Trujillo. 49 p.
- Sanger, F; Nicklen, S; Coulson, AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 74(12):5463-5467. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>.
- Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria (SEPSA). 2021. Informe Comercio Exterior del Sector Agropecuario 2019-2020 (en línea). San José, Costa Rica. Consultado ago. 2021. Disponible en http://www.sepsa.go.cr/docs/2021-003-Comercio_Exterior_2019-2020.pdf
- Singleton, P; Sainsbury, D. 2006. *Fusarium* from Dictionary of Microbiology & Molecular Biology. 3 ed. Chicago, United States, John Wiley & Sons Ltd. p. 71-93.
- Summerell, BA. 2019. Resolving *Fusarium*: Current Status of the Genus. Annual Review of Phytopathology 57(1):323-339. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082718-100204>.
- Summerell, BA; Salleh, B; Leslie, J. 2003. A Utilitarian approach to *Fusarium* identification. Plant Disease 87(2):117-128. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.2.117>.
- Ulate, M. 2018. Identificación, patogenicidad y respuesta al metalaxil de aislamientos de *Phytophthora* spp. de diez fincas piñeras en Costa Rica. Tesis M.Sc. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 96 p.
- Vásquez, J; Mata, X. 2014. Diagnosis of *Fusarium oxysporum* in the cultivation of pineapple *Ananas comosus* (L) Merr. Net Journal of Agricultural Science 2(3):107-112.

- Vásquez-Jiménez, J. 2009. Evaluación de la eficacia in vitro de sustancias químicas y microorganismos antagónicos del género *Trichoderma* spp., como herramienta para la toma de decisiones en el control de enfermedades “caso muerte descendente del cultivo de piña *Ananas comosus* (L) Merr”. Tesis Lic. San Carlos, Costa Rica, Instituto Tecnológico de Costa Rica. 75 p.
- Ventura, JA; Zambolim, L; Gilbertson, L. 1993. Proposicao de nova forma specialis em *Fusarium subglutinans* no abacaxizeiro. Fitopatologia Brasileira 18:280.
- Vindas, A; Blanco, H. 2013. Control de *Dysmicoccus brevipes* (Hemiptera: Pseudococcidae), en el fruto de piña, San Carlos, Costa Rica. Agronomía Costarricense 37(1):103-111.
- White, TJ; Bruns, T; Lee, S; Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Innis, DH; Gelfand, JJ; Sninsky, TJ (eds.). PCR Protocols: A guide to Methods and Applications. San Diego, USA, Editorial M. A. White Academic Press. p. 315-322.



Todos los derechos reservados. Universidad de Costa Rica. Este artículo se encuentra licenciado con Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Costa Rica. Para mayor información escribir a rac.cia@ucr.ac.cr

NIVEL DE INFECCIÓN DEL MICROSPORIDIO *Nosema* spp. EN COLMENAS DE ABEJAS AFRICANIZADAS Y SU RELACIÓN CON LA PRECIPITACIÓN Y HUMEDAD RELATIVA

Rafael A. Calderón-Fallas¹*, Eduardo Moreno-Morales²

Palabras clave: Apicultura; Nosemosis; esporas; nivel de infección; época lluviosa.

Keywords: Apiculture; Nosemosis; spores; infection level; rainy season.

Recibido: 02/12/2020 Aceptado: 14/06/2021

RESUMEN

Introducción. La Nosemosis es una enfermedad de las abejas melíferas, que se encuentra diseminada por todo el mundo y ocasiona pérdidas económicas. Es causada por 2 especies de hongos, *Nosema apis* y *Nosema ceranae*. **Objetivo.** Se determinó la cantidad de esporas de *Nosema* spp. en muestras grupales e individuales de abejas, y se relacionaron con la precipitación y humedad. **Materiales y métodos.** El estudio se realizó de julio a noviembre 2017, en 10 colmenas de abejas africanizadas en Atenas, Alajuela. De cada colmena, se colectaron 100 abejas, para examinarlas en el laboratorio de Patología Apícola-CINAT. Para el análisis grupal, se cortaron los abdómenes de 30 abejas y se maceraron con 30 ml de agua destilada. La muestra se revisó en el microscopio a 40x y se cuantificaron las esporas de *Nosema* spp. mediante el hemocitómetro. Para el examen individual, se utilizó la misma técnica. La precipitación y humedad

ABSTRACT

Infection level of microsporidium *Nosema* spp. in africanized honey bee colonies and their relationship with precipitation and relative humidity. Introduction. Nosemosis is the most widespread of adult honey bee diseases that cause significant economic losses worldwide. Honey bees are parasitized by 2 fungus species, *Nosema apis* and *Nosema ceranae*. **Objective.** The amount of spores of *Nosema* spp. in group and individual samples of adult bees was related with precipitation and relative humidity conditions. **Materials and methods.** This study was conducted from July to November 2017, in 10 africanized honey bees colonies in Atenas, Alajuela. A 100 foragers bees were collected per colony to examine them at the Bee Pathology Lab of CINAT. For the group analysis, the abdomens of thirty adult bees were cut and macerated together in 30 ml of distilled water. *Nosema* spp. spores were identified

* Autor para correspondencia. Correo electrónico: rafael.calderon.fallas@una.cr

1 Universidad Nacional, Centro de Investigaciones Apícolas Tropicales, Programa Integrado de Patología Apícola, Heredia, Costa Rica.

 0000-0002-6991-6899.

2 Universidad Nacional, Centro de Investigaciones Apícolas Tropicales, Programa Integrado de Patología Apícola, Heredia, Costa Rica.

 0000-0001-8286-8193.

relativa durante el estudio, se relacionaron con el número de esporas. **Resultados y conclusión.** Se detectó el microsporidio *Nosema* spp. en todas las colmenas analizadas. En julio, se cuantificó el mayor número de esporas, con un promedio de $20\ 360\ 000 \pm 1\ 586\ 957$ en el análisis grupal y $12\ 749\ 733 \pm 867\ 232$ en el individual. En los meses siguientes se observó un descenso en el conteo de esporas en ambos métodos, hasta contabilizar la menor cantidad en noviembre, con un promedio de $4\ 375\ 000 \pm 874\ 132$ y $2\ 087\ 708 \pm 398\ 895$ en el examen grupal e individual, respectivamente. Al relacionar la precipitación y humedad con la cantidad de esporas, setiembre presentó la mayor cantidad de lluvia y un alto porcentaje de humedad, sin embargo, no correspondió con el mayor nivel de Nosemosis, el cual se registró en julio. Mientras que noviembre fue el menos lluvioso y húmedo, y mostró la menor cantidad de esporas.

using a light microscopy at 40x magnification and counted with the hemocytometer. For the individual analysis, the same method was used. Precipitation and relative humidity conditions during the study period were related with the amount of *Nosema* spp. spores. **Results and conclusion.** The microsporidium *Nosema* spp. was found in all colonies. In July, the highest number of *Nosema* spores were quantified, with an average of $20\ 360\ 000 \pm 1\ 586\ 957$ per bee in group analysis and $12\ 749\ 733 \pm 867\ 232$ in individual analysis. In the following months a decrease in the number of spores was observed and the lowest amount of spores was recorded in November, with an average of $4\ 375\ 000 \pm 874\ 132$ and $2\ 087\ 708 \pm 398\ 895$ of spores in group and individual exam, respectively. When relating the conditions of precipitation and humidity with the amount of spores, September presented the highest amount of rain and a high percentage of humidity, nevertheless, it did not correspond to the highest infection level of *Nosema* spp., which occurred in July. Meanwhile, November was the least rainy and humid month and in turn presented the least amount of spores.

INTRODUCCIÓN

La alta eficiencia polinizadora de las abejas melíferas (*Apis mellifera* L.), ha conllevado a una demanda creciente de este servicio a nivel mundial en diversos cultivos agrícolas, como el melón, la sandía y el almendro, entre otros. Sin embargo, se ha reportado en diferentes países como España, Francia, Suiza y Alemania, pérdidas considerables de colmenas. Asimismo, se ha indicado una severa disminución de colonias en diferentes zonas de los Estados Unidos (Botías *et al.* 2012, Eiri *et al.* 2015). Sin conocer con exactitud la causa de la pérdida de colmenas, algunos investigadores lo atribuyen a ciertos factores como el uso excesivo de plaguicidas en

la agricultura y a la presencia de enfermedades en las abejas melíferas, como la Nosemiasis (Soroker *et al.* 2011, Botías *et al.* 2012, Tozkar *et al.* 2015).

La Nosemiasis o Nosemosis, es una enfermedad diseminada por todo el mundo que causa pérdidas económicas en la apicultura (Fries *et al.* 1996, Fries 2010). En Costa Rica, la Nosemosis es causada por *N. ceranae*, se determinó por primera vez en el 2006 (Calderón *et al.* 2008). Es ocasionada por 2 especies de microsporidios, *Nosema apis* y *Nosema ceranae*, ambas forman esporas y al ser ingeridas por la abeja llegan al intestino, donde infectan las células epiteliales, se desarrollan y multiplican, luego pasan al recto

y son liberadas con las heces (Traver y Fell 2011, Muñoz *et al.* 2014).

La Nosemosis se transmite entre las abejas a través del intercambio de alimento (trofalaxis), durante la limpieza de panales por parte de las obreras o mediante la ingestión de esporas presentes en el agua y/o alimento contaminado (Higes *et al.* 2007, Chihu *et al.* 2013). La abeja reina se infecta a través de la jalea real proporcionada por las abejas nodrizas enfermas, mientras que los zánganos se contagian al recibir de las obreras, alimento con esporas (Maside *et al.* 2015). Entre colmenas, la Nosemosis se transfiere por pillaje, deriva, manejo inadecuado por parte del apicultor, o por la introducción de colmenas enfermas a los apiarios (Calderón y Pichardo 2011, Prendas *et al.* 2018).

La intensidad de la infección varía con la época del año, las condiciones ambientales (temperatura, humedad relativa y precipitación) y la ubicación del apiario (sombra o semisombra) (Fries 2010, Traver y Fell 2011, Jack *et al.* 2016, Ptaszynska *et al.* 2016). Se ha reportado, que apiarios ubicados en lugares húmedos y con exceso de sombra, son propensos a presentar niveles elevados de *Nosema* spp. (Biganski *et al.* 2017). La Nosemosis puede permanecer latente durante todo el año y manifestarse después de períodos de hacinamiento de las abejas dentro de la colmena, debido a lluvias persistentes, fríos intensos o fuertes vientos, ya que estas condiciones favorecen el contacto y contagio entre las abejas (Calderón y Ramírez 2013). Algunos de los principales síntomas que se observan en abejas, *A. mellifera*, altamente infectadas por *Nosema* spp., son abejas arrastrándose en frente de la colmena debido a la imposibilidad de volar por la compresión de los sacos aéreos abdominales, así como deyecciones diarreicas de color café sobre los marcos, bastidores y frente a la piquera (Chihu *et al.* 2013). Lo anterior causa disminución en la población de abejas adultas y en la cantidad de cría, reducción en la producción de miel y en casos muy severos, perdida de la colmena (Chihu *et al.* 2013).

El diagnóstico de laboratorio de la Nosemosis, consiste en el análisis de una muestra grupal de aproximadamente 30 a 60 abejas adultas por colmena, mediante el cual se obtiene un estimado de la cantidad de esporas por abeja (Calderón y Sánchez 2011, Botías *et al.* 2012). Sin embargo, se ha reportado que, al aplicar esta metodología, en condiciones particulares, podrían obtenerse resultados muy variables en la medición de infección entre individuos de una misma colmena (Mulholland *et al.* 2012). Algunas personas autoras mencionan que el análisis individual de abejas es un indicador más confiable del nivel de infección de la colonia. No obstante, estudios sobre la presencia de *Nosema* spp. en abejas individuales, son escasos (Higes *et al.* 2008, Mulholland *et al.* 2012).

Debido a la poca investigación relacionada con la Nosemosis en abejas africanizadas bajo condiciones tropicales, se realizó el presente estudio con el objetivo de determinar la cantidad de esporas y el nivel de infección del microsporidio *Nosema* spp. en muestras grupales e individuales de abejas adultas y su relación con las condiciones de precipitación y humedad relativa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del apiario. La investigación se realizó en un apiario constituido por 10 colmenas de abejas africanizadas (*A. mellifera*), ubicado en el cantón de Atenas (09°57'45" N y 84°21'50" O, 535 msnm), provincia de Alajuela. Atenas se clasifica como bosque húmedo premontano, con una temperatura promedio anual de 25°C y una precipitación entre 1011 y 2022 mm (IMN 2017). El estudio se llevó a cabo de julio a noviembre 2017 (época lluviosa), meses en los cuales se ha reportado una mayor incidencia de Nosemosis en las colmenas (Calderón y Pichardo 2011, Pichardo *et al.* 2012, Calderón y Ramírez 2013). Se confirmó la presencia de *Nosema* spp. mediante análisis de laboratorio de las abejas adultas, las cuales adquirieron el microsporidio de manera natural.

Colecta de abejas. Para realizar el diagnóstico de Nosemosis, se muestraron 10 colmenas con un intervalo de 30 días entre los muestreos. De cada colmena se colectaron aproximadamente 100 abejas adultas de la piquera (entrada), con el fin de muestrear abejas pecoreadoras (con más de 21 días de edad) (Higes *et al.* 2010, OIE 2013, Medina *et al.* 2014). Para obtener la muestra de abejas, la piquera de la colmena se cerró temporalmente con papel periódico, durante unos 20 - 30 minutos en horas de la mañana (9:00 am - 11:00 am) (Higes *et al.* 2008). Al observarse un número considerable de abejas pecoreadoras agrupadas frente a la piquera, se procedió a colectarlas en un frasco de boca ancha con alcohol etílico al 70%. Las muestras se identificaron con la fecha y el número de la colmena.

Análisis de abejas. Las abejas adultas se analizaron en el Laboratorio de Patología Apícola del Centro de Investigaciones Apícolas Tropicales (CINAT), Universidad Nacional, ubicado en el Campus Benjamín Núñez, Lagunilla de Heredia. Para determinar la presencia de esporas de *Nosema* spp., las abejas se analizaron mediante el método de Cantwell (método directo) (Molina *et al.* 1990, Calderón y Sánchez 2007). De cada muestra se tomaron 30 abejas adultas, se procedió a cortar los abdómenes, los cuales se maceraron en un mortero y se añadió 1 ml de agua destilada por cada abdomen (total 30 ml). El macerado se agitó constantemente durante un minuto y luego se colocó una gota de la suspensión en un portaobjetos. Para identificar la presencia del microsporidio, la muestra se revisó en el microscopio a un aumento de 40x. Las esporas se identificaron por ser ovaladas, brillantes y refringentes.

Cuantificación del nivel de infección de *Nosema* spp. Se procedió a cuantificar las esporas y determinar el nivel de infección de cada colmena mediante el hemocitómetro (Calderón y Pichardo 2011). Se realizó el análisis grupal de 30 abejas y el examen individual de 30 abejas provenientes de la misma colmena.

Evaluación de una muestra grupal de abejas. Para cuantificar las esporas de *Nosema* spp. presentes en una muestra grupal de abejas, se procedió a agitar de manera mecánica el líquido sobrenadante para homogenizarlo y con una micropipeta se tomó una alícuota de 200 μ l, la cual se colocó en el hemocitómetro y se dejó reposar durante 3 minutos, para permitir la sedimentación de las esporas. La muestra se observó en el microscopio a un aumento de 40x y se procedió al conteo de esporas de 5 bloques del hemocitómetro (los 4 de las esquinas y el central) (Molina *et al.* 1990).

El nivel de infección se determinó con la siguiente fórmula:

$$\text{Número de esporas por abeja} = (\text{total de esporas contadas} / 80) \times 4\,000\,000.$$

El total de esporas contadas, son las presentes en los 5 bloques del hemocitómetro.

El 80, representa el total de campos contados en los 5 bloques del hemocitómetro.

Los 4 000 000, corresponde al volumen de dilución de la muestra.

Examen de abejas individuales. Para analizar el nivel de infección de *Nosema* spp. en 30 abejas por colmena (n= 10 colmenas), igualmente se utilizó la técnica del hemocitómetro. Se analizó cada una de las abejas de manera individual (n= 300 abejas analizadas por mes), con el macerado del abdomen y se agregó 1 ml de agua destilada. Luego se colocó 10 μ l del líquido sobrenadante en el hemocitómetro, se observó en el microscopio a un aumento de 40x y se procedió al conteo de las esporas. Para obtener el nivel de infección se utilizó la fórmula indicada anteriormente.

El procedimiento se repitió hasta determinar el nivel de infección de cada una de las 30 abejas analizadas individualmente por colmena.

Nivel de infección de Nosemosis. Para categorizar el nivel de infección de *Nosema* spp., el número de esporas de cada muestra, determinado mediante la fórmula, se comparó con la tabla de Jaycox (Tabla 1).

Tabla 1. Nivel de intensidad de infección por Nosemosis en abejas melíferas (Jaycox).

Nivel de infección	Intensidad	Cantidad de esporas
Nulo	0	Menos de 10 000
Muy leve	1	10 000 – 1 000 000
Leve	2	1 000 001 – 5 000 000
Moderado	3	5 000 001 – 10 000 000
Semifuerte	4	10 000 001 – 20 000 000
Fuerte	5	Superior a 20 000 000

Molina *et al.* 1990.

Datos meteorológicos. Los datos de precipitación, humedad relativa y temperatura en el cantón de Atenas durante julio a noviembre, se proporcionaron por el Instituto Meteorológico Nacional (IMN 2017). La precipitación y humedad se relacionaron con el número de esporas del microsporidio *Nosema* spp. en muestras grupales e individuales de abejas adultas.

Análisis estadístico. La cantidad de esporas, obtenida en el análisis de muestras grupales, se digitó en una tabla de Microsoft Excel®, la cual se ingresó al programa estadístico Minitab®, siendo clasificadas por el número de colmena y el mes de evaluación. Asimismo, se digitó el número de esporas determinadas en muestras de abejas individuales, se incluyeron como variables el número de abeja, el número de colmena y el mes de evaluación. En este último caso, se obtuvo el promedio de esporas presentes en abejas individuales por colmena. Para la cantidad de esporas,

se calcularon estadísticas descriptivas (promedio e intervalos de confianza, la mediana, el valor máximo y mínimo) y medidas de variación (desviación estándar, error estándar y el coeficiente de variación) por mes y para cada método de evaluación. La dinámica de la infección de *Nosema* spp. durante el estudio, se presentó en gráficos de líneas, en los que se utilizó el promedio de esporas de abejas individuales por colmena. La precipitación y humedad relativa se relacionaron con el número de esporas de *Nosema* spp., determinadas mediante los métodos grupal e individual.

RESULTADOS

Nosemosis en muestras grupales de abejas

Se determinó la presencia del microsporidio *Nosema* spp. en todas las colmenas analizadas (n= 10), durante la época lluviosa. En julio, se determinó la mayor cantidad de esporas de *Nosema* spp. en el apiario, con un promedio de $20\ 360\ 000 \pm 1\ 586\ 957$ por abeja. En el mes siguiente la infección fue significativamente inferior, encontrándose en promedio $9\ 595\ 000 \pm 2\ 602\ 866$ esporas ($p<0,0001$). En setiembre, se cuantificaron $6\ 230\ 000 \pm 1\ 396\ 945$ de esporas por abeja, mientras que en octubre se registró un leve incremento. Finalmente, en noviembre, se obtuvo la menor cantidad de esporas, con un promedio de $4\ 375\ 000 \pm 874\ 132$ (Figura 1). No se encontraron diferencias significativas de agosto a noviembre (ANOVA - significancia 0,05) (Figura 2).

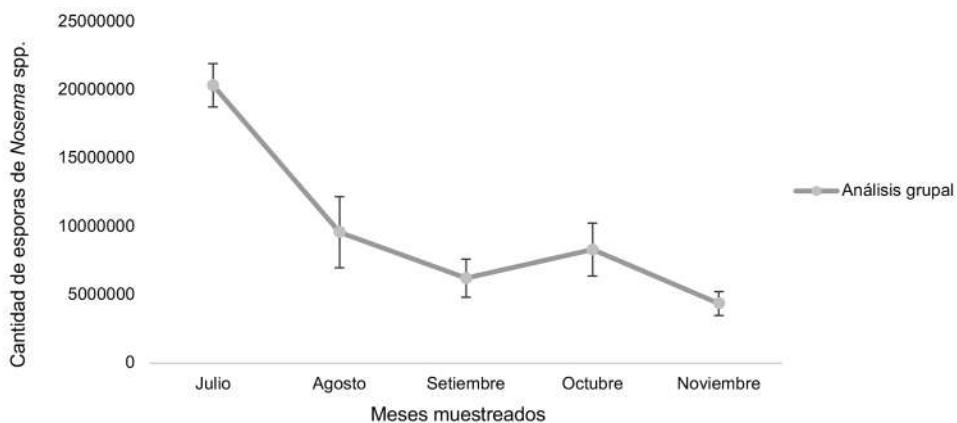


Figura 1. Esporas de *Nosema* spp. en muestras grupales de abejas adultas durante la época lluviosa ($\bar{x} \pm SE$).

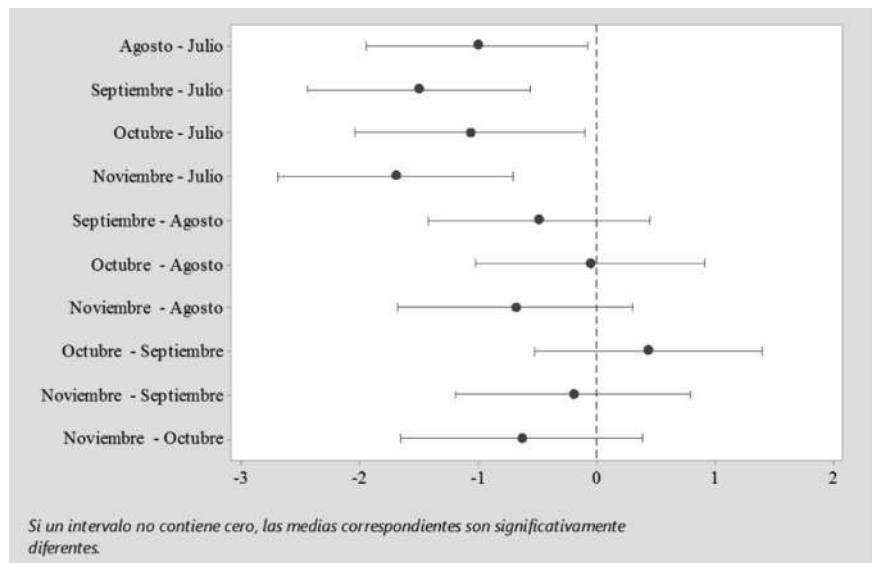


Figura 2. Análisis de la cantidad de esporas de *Nosema* spp. durante los meses muestreados (ANOVA= Prueba de Tukey, significancia 0,05).

Nosemosis en muestras individuales de abejas

Se determinó la presencia del microsporidio *Nosema* spp. en muestras de abejas individuales (240 a 300 abejas por mes) durante el periodo de estudio. En julio se contabilizó la mayor cantidad de esporas, con un promedio de $12\ 749\ 733 \pm 867\ 232$ por abeja, y resultó significativamente mayor que los siguientes meses

analizados, en los cuales la infección por Nosemosis fue menor a 10 000 000 de esporas. En agosto se cuantificó la segunda cifra más alta de esporas, siendo de $7\ 367\ 267 \pm 716\ 697$ por abeja. Durante setiembre y octubre el promedio continuó con disminución, hasta noviembre donde se alcanzó la menor cantidad $2\ 087\ 708 \pm 398\ 895$ de esporas por abeja (Figura 3).

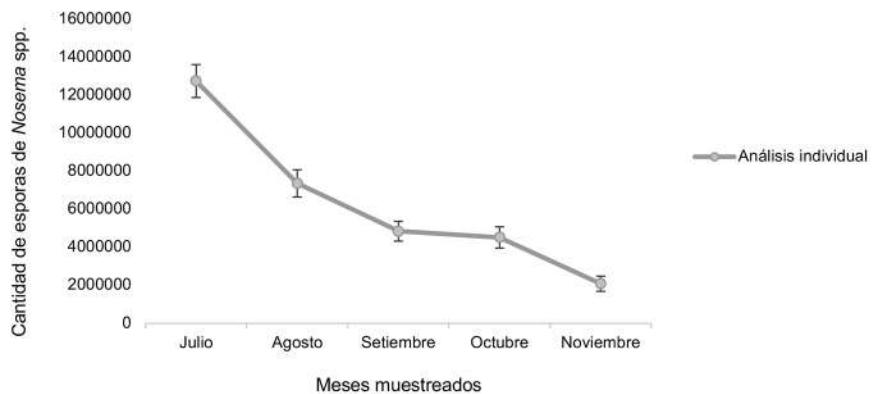


Figura 3. Promedio del conteo de esporas de *Nosema* spp. en muestras individuales de abejas durante los meses de la época lluviosa ($\bar{x} \pm \text{SE}$).

Relación de las condiciones de precipitación y humedad relativa con la cantidad de esporas de *Nosema* spp.

De acuerdo con la información suministrada por el Instituto Meteorológico Nacional (IMN), las variables meteorológicas que presentaron cambios en los meses de estudio, son la precipitación y la humedad relativa, mientras que la temperatura se mantuvo constante entre 23,9°C y 24,2°C. Al relacionar la precipitación y

el porcentaje de humedad relativa con la cantidad de esporas, tanto en el análisis grupal como en el individual, se observa que setiembre presentó la mayor cantidad de lluvia (650 mm) y un alto porcentaje de humedad (90,4%); sin embargo, no correspondió con los mayores niveles de infección del microsporidio, los cuales se observaron en julio. Mientras que noviembre, fue el mes menos lluvioso (126 mm) y húmedo (87,5%), y a su vez presentó la menor cantidad de esporas por abeja (Figuras 4 y 5).

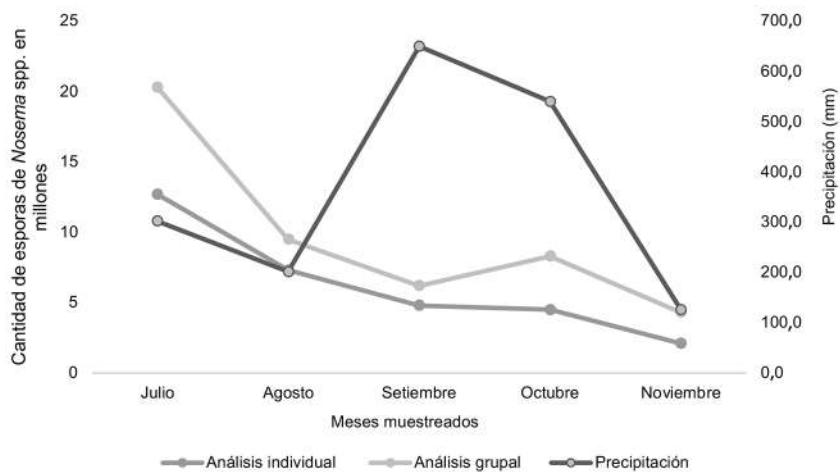


Figura 4. Esporas de *Nosema* spp. obtenidas en muestras grupales e individuales de abejas y nivel de precipitación entre julio y noviembre.

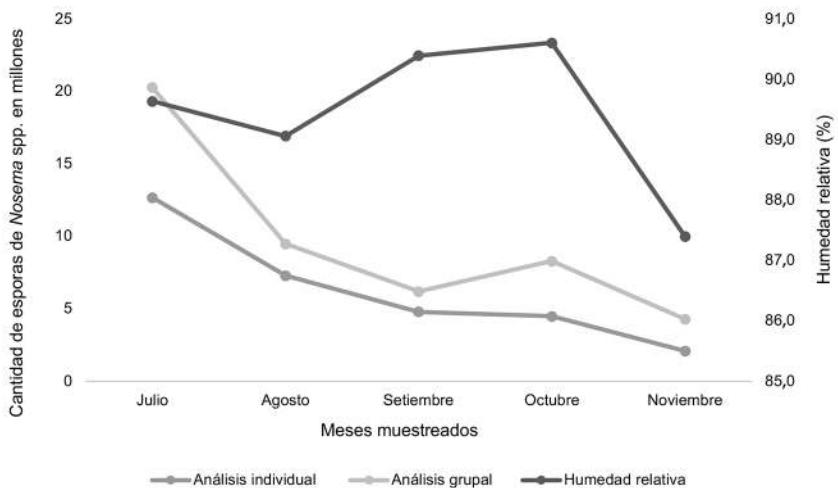


Figura 5. Conteo de esporas de *Nosema* spp. en muestras grupales e individuales de abejas y porcentaje de humedad relativa durante el periodo de estudio.

DISCUSIÓN

Como se mencionó, la Nosemosis es una de las enfermedades que más pérdidas económicas causa en la apicultura mundial (Fries *et al.* 2013, Grupe y Quandt 2020). Diversos estudios en España, indican un aumento considerable en la pérdida de colmenas de abejas de tipo europeo infectadas con *N. ceranae* (Higes *et al.* 2010, Botías *et al.* 2013). En esta investigación con abejas africanizadas, se determinó la presencia de Nosemosis en todas las colmenas (prevalencia= 100%), tanto en el análisis grupal como en el individual, con diferentes niveles de infección, desde muy leves hasta fuertes. Algunos factores que favorecen a la Nosemosis están relacionados con la ingesta de esporas. Se menciona que las abejas jóvenes adquieren las esporas cuando realizan actividades de limpieza en colmenas contaminadas (Martínez *et al.* 2011). Según Ritter (2001) panales viejos en la cámara de cría, propician la presencia de Nosemosis. En el presente ensayo, se observaron panales muy oscuros en las colmenas, con mucho tiempo de no cambiarse. En estas condiciones, podrían ser una fuente de contaminación de *Nosema* spp., ya que las esporas suelen permanecer viables, hasta

por un año (DeGrandi-Hoffman y Chen 2015, Rodríguez *et al.* 2021).

El mayor conteo de esporas obtenido en ambos métodos durante la época lluviosa se registró en julio. Una de las posibles causas podría estar relacionada con el hacinamiento de las abejas debido a lluvias prolongadas. Aun en julio que no fue el mes con mayor precipitación (302 mm), ocasionalmente se presentaron lluvias persistentes desde horas de la mañana, y permanecieron durante todo el día. Debido a que las abejas en estas condiciones no pueden defecar fuera de la colmena y al estrecho contacto entre ellas, probablemente favoreció la diseminación del microsporidio. Se ha reportado que largos períodos de encierro de las abejas en la colmena (hacinamiento), ocasionados principalmente por lluvias persistentes, promueven la presencia de *Nosema* spp. Entre más extensa es la duración del hacinamiento, mayor es la cantidad de esporas, ya que los niveles de infección se elevan considerablemente, debido al contacto estrecho entre las abejas (Fries *et al.* 2013).

En los siguientes meses (agosto - octubre), hubo un descenso en la cantidad de esporas con respecto a julio, tanto en el análisis grupal como

en el individual. Lo anterior representa un cambio considerable respecto a lo esperado, ya que las condiciones de precipitación y humedad, que se han reportado, favorecen el incremento de la Nosemosis, en setiembre (650 mm, 90,4%) y octubre (540 mm, 90,6%) (IMN 2017). Las causas de esta disminución, no se conocen con exactitud, no obstante, se debe mencionar que durante esos meses se presentaron las condiciones propias de la época lluviosa, con mañanas soleadas y tardes lluviosas. Esta condición, permitió que las abejas realizaran sus actividades fuera de la colmena durante horas tempranas del día, sobre todo la defecación. Estos resultados coinciden con los reportados por Tapia *et al.* (2017) con abejas africanizadas en México, donde determinaron una disminución en el conteo de esporas durante la estación lluviosa, comparado con la época seca. Igualmente, Emser *et al.* (2015) indicaron bajos niveles de infección de *Nosema* spp. durante el invierno, los cuales aumentaron en el verano. Adicionalmente, Retschnig *et al.* (2017) indican que la mayor intensidad del microsporidio se presentó en invierno.

En noviembre, se registró con ambos métodos, el conteo más bajo de esporas. Se debe señalar que, durante este periodo, se observó una reducción en la cantidad de lluvia, con el inicio de la transición hacia la época seca, con las condiciones más bajas de precipitación (126,2 mm) y humedad (87,4%) (IMN 2017). Lo anterior coincide con Calderón y Ramírez (2013), quienes indican que a menor cantidad de lluvia las esporas de *Nosema* spp. disminuyen.

Precipitación y humedad relativa

Al relacionar el número de esporas del microsporidio *Nosema* spp. (obtenido en ambos métodos) con la precipitación y humedad, se evidenció durante julio la cifra más elevada de esporas en el apiario, mientras que la humedad y precipitación correspondieron a la tercera más alta registrada durante el periodo de investigación. Como se indicó, el conteo elevado de esporas en julio, podría relacionarse con el

hacinamiento de las abejas como consecuencia de lluvias persistentes.

Cueto *et al.* (2020) indicaron una alta prevalencia y distribución de Nosemosis entre marzo y junio, lo cual corresponde a las temporadas de primavera e inicio del verano (mayor actividad estacional de las abejas melíferas) en 4 regiones geográficas del norte de México.

Setiembre, presentó la mayor cantidad de lluvia y un alto porcentaje de humedad, no obstante, no correspondió con los mayores niveles de infección de *Nosema* spp. en las colmenas. Según Rangel *et al.* (2015) esto obedece a que la lluvia, no es un factor que determina el nivel de infección de Nosemosis en el apiario. Pacini *et al.* (2016) indican que apíarios ubicados en distintas eco-regiones de Argentina, mostraron diferencias en la cantidad de esporas, al registrar conteos menores en condiciones de bosque y en lugares con suelo cubierto de pasto. Sobre esta condición Calderón y Ramírez (2013), reportaron que apíarios ubicados en sitios húmedos y con mucha sombra, tienden a presentar niveles más elevados de infección, que los situados en lugares donde predominen las condiciones secas y soleadas.

Se comprobó que en noviembre se cuantificó la menor cantidad de esporas de *Nosema* spp. por abeja. En ese mes se observó una reducción considerable en la cantidad de lluvia y el inicio de la floración. Lo anterior coincide con lo observado por Calderón y Ramírez (2013), quienes encontraron que, a menor cantidad de lluvia, se reduce el número de esporas en el apiario.

En conclusión, se observó que, al relacionar la precipitación y el porcentaje de humedad relativa con la cantidad de esporas, tanto en el análisis grupal como el individual, el mes de setiembre presentó la mayor cantidad de lluvia y un alto porcentaje de humedad, sin embargo, no correspondió con los mayores niveles de infección de Nosemosis, los cuales se presentaron en julio. Mientras que noviembre, fue el periodo menos lluvioso y húmedo, y a su vez presentó la menor cantidad de esporas de *Nosema* spp. por abeja.

AGRADECIMIENTOS

Deseamos agradecer a los estudiantes que prepararon muestras de abejas adultas en el laboratorio. Un agradecimiento a M.Sc. Fernando Ramírez Arias y Tec. Guillermo Ramírez Arias (CINAT-UNA), por colaborar en el manejo general de las colmenas durante el estudio.

LITERATURA CITADA

- Biganski, S; Kurze, C; Müller, M; Moritz, R. 2017. Social response of healthy honeybees towards *Nosema ceranae* -infected workers: care or kill? *Apidologie* 49(3):325-334.
- Botías, C; Martín-Hernández, R; Barrios, L; Meana, A; Higes, M. 2013. *Nosema* spp. infection and its negative effects on honeybees (*Apis mellifera iberiensis*) at the colony level. *Veterinary Research* 44:25. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1297-9716-44-25>.
- Botías, C; Martín-Hernández, R; Meana, A; Higes, M. 2012. Critical aspects of the *Nosema* spp. diagnostic sampling in honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies. *Parasitology Research* 110:2557-2561.
- Calderón, RA; Pichardo, J. 2011. Nosemiasis en abejas melíferas: diagnóstico, control y prevalencia. Heredia, Costa Rica. Departamento de Publicaciones e Impresiones UNA. 52 p.
- Calderón, RA; Ramírez, F. 2013. Enfermedades de las abejas melíferas, con énfasis en abejas africanizadas. Heredia, Costa Rica. Editorial UNA (EUNA). 137 p.
- Calderón, RA; Sánchez, L; Yañez, O; Fallas, N. 2008. Presence of *Nosema ceranae* in Africanized honey bee colonies in Costa Rica. *Journal of Apicultural Research and Bee World* 47:328-329.
- Calderón, RA; Sánchez, L. 2007. Detección de enfermedades en abejas africanizadas en Costa Rica. *Revista Ciencias Veterinarias* 25(2):335-348.
- Calderón, RA; Sánchez, L. 2011. Diagnóstico de enfermedades en colmenas de abejas africanizadas en Costa Rica: prevalencia y distribución de setiembre a noviembre del 2007. *Agronomía Costarricense* 35(2):49-60.
- Chihu, L; Chihu, D; Fernández, M. 2013. *Nosema ceranae*, un patógeno emergente en la apicultura mundial. Leipzig, Alemania. Editorial Académica española. 112 p.
- Cueto, SA; López, G; Orozco, C; Gómez, SD; Moreno, K; Espinoza, KO; Guerrero, JG; Silva, LE; Trasviña, E; Monge, FJ. 2020. Prevalence and geographical distribution of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in apiaries of Northwest of Mexico using a duplex real time PCR with melting curve. *Journal of Apicultural Research* 59(2):195-203.
- DeGrandi-Hoffman, G; Chen, Y. 2015. Nutrition, immunity and viral infections in honeybees. *ScienceDirect* 10:170-176.
- Eiri, D; Suwannapong, G; Endler, M; Nieh, J. 2015. *Nosema ceranae* can infect honeybee larvae and reduces subsequent adult longevity. *PLOS ONE* 10(5):1-17.
- Emsen, B; Guzman-Novoa, E; Hamiduzzaman, M; Eccles, L; Lacey, B; Ruiz-Pérez, R; Nasr, M. 2015. Higher prevalence and levels of *Nosema ceranae* than *Nosema apis* infections in Canadian honeybee colonies. *Parasitology Research* 115(1):175-181.
- Fries, I; Chauzat, M; Chen, Y; Doublet, V; Genersh, E; Gister, S; Williams, G. 2013. Standard methods for *Nosema* research. *Journal of Apicultural Research* 52(1):1-28.
- Fries, I; Feng, F; Da Silva, A; Slemenda, SB; Pieniazek, J. 1996. *Nosema ceranae* (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honeybee *Apis ceranae* (Hymenoptera, Apidae). *Journal of Protistology* 32:356-365.
- Fries, I. 2010. *Nosema ceranae* in European honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* 103:S73-S79.
- Grupe, AC; Quandt, CA. 2020. A growing pandemic: A review of *Nosema* parasites in globally distributed domesticated and native bees. *PLoS Pathogens* 16(6):1-8.
- Higes, M; García-Palencia, R; Martín-Hernández, R; Meana, A. 2007. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Journal of Invertebrate Pathology* 94(3):211-217.
- Higes, M; Martín-Hernández, R; Botías, C; Bailón, EG; González-Porto, AV; Barrios, L; Meana, A. 2008. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental Microbiology* 10(10):2659-2669.
- Higes, M; Martín-Hernández, R; Meana, A. 2010. *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C Nosemosis. *Apidologie* 41:375-392.
- IMN (Instituto Meteorológico Nacional). 2017. Regiones y subregiones climáticas del país (en línea). Consultado 14 may. 2018. Disponible en https://www.imn.ac.cr/publicaciones/estudios/Reg_climaCR.pdf
- Jack, C; Lucas, H; Webster, T; Sagili, R. 2016. Colony level prevalence and intensity of *Nosema ceranae* in honeybees (*Apis mellifera* L.). *PLOS ONE* 11(9):1-20.
- Martínez, J; Medina, L; Catzín, A. 2011. Frecuencia de *Varroa destructor*, *Nosema apis* y *Acarapis woodi* en colonias manejadas y enjambres silvestres de abejas (*Apis mellifera*) en Mérida, Yucatán, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 2(1):25-38.
- Maside, X; Gómez-Moracho, T; Jara, L; Martín-Hernández, R; De la Rúa, P; Higes, M; Bartolomé, C. 2015. Population genetics of *Nosema apis* and *Nosema*

- ceranae*: One host (*Apis mellifera*) and two different histories. PLOS ONE 10(12):1-21.
- Medina, C; Guzmán, E; Espinosa, L; Uribe, L; Gutiérrez, R; Gutiérrez, F. 2014. Frecuencia de Varroosis y Nosemosis en colonias de abejas melíferas (*Apis mellifera*) en el estado de Zacatecas, México. Revista Chapingo serie Ciencias Forestales y del Ambiente 10:30-36.
- Molina, A; Guzmán, E; Message, D; De Jong, D; Pesante, D; Mantilla, C; Meneses, G. 1990. Enfermedades y plagas de la abeja melífera occidental. San Salvador, El Salvador. OIRSA-BID. 147 p.
- Mulholland, G; Traver, B; Johnson, N; Fell, R. 2012. Individual variability of *Nosema ceranae* infections in *Apis mellifera* colonies. Insects 3:1143-1155.
- Muñoz, I; Cepero, A; Pinto, M; Martín-Hernández, R; Higes, M; De la Rúa, P. 2014. Presence of *Nosema ceranae* associated with honeybee queen introductions. Infection, Genetics and Evolution 23:161-168.
- OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal). 2013. Manual de las pruebas de diagnóstico y las vacunas para los animales terrestres (en línea). Consultado 20 oct. 2019. Disponible en <http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>
- Pacini, A; Giacobino, A; Molineri, A; Bulacio, N; Aignasse, A; Zago, L; Signorini, M. 2016. Risk factors associated with the abundance of *Nosema* spp. in apiaries located in temperate and subtropical conditions after honey harvest. Journal of Apicultural Research 55(4):342-350.
- Pichardo, J; Calderón, RA; van Veen, J; Ramírez, F. 2012. Nosemosis en abejas Africanizadas: detección en cámara de cría y piquera. Notas Apícolas 15:26-33.
- Prendas-Rojas, J; Figueroa-Mata, G; Ramírez-Montero, M; Calderón-Fallas, RA; Ramírez-Bogantes, M; Travieso-González, C. 2018. Diagnóstico automático de infestación por Nosemosis en abejas melíferas mediante procesado de imágenes. Revista Tecnología en Marcha 31(2):14-25.
- Ptaszynska, A; Paleolog, J; Borsuk, G. 2016. *Nosema ceranae* infection promotes proliferation of yeasts in honeybee intestines. PLOS ONE 11(10):1-15.
- Rangel, J; Baum, K; Rubink, W; Coulson, R; Johnston, J; Traver, E. 2015. Prevalence of *Nosema* species in a feral honeybee population: a 20-year survey. Apidologie 47:561-571.
- Retschnig, G; Williams, G; Schneeberger, A; Neumann, P. 2017. Cold ambient temperature promotes *Nosema* spp. intensity in honey bees (*Apis mellifera*). Insects 8(1):20. DOI: <https://dx.doi.org/10.3390%2Finsects8010020>.
- Ritter, W. 2001. Enfermedades de las abejas. Zaragoza, España, Editorial Acribia S.A. 146 p.
- Rodríguez, C; Higes, M; Martin, R. 2021. Sporicidal evaluation of different substances against *Nosema ceranae* for surface disinfection. Journal of Apicultural Research. DOI: [10.1080/00218839.2021.1933750](https://doi.org/10.1080/00218839.2021.1933750). Early Access.
- Soroker, VA; Hetzroni, B; Yakobson, D; David, A; David, H; Voet, Y. 2011. Evaluation of colony losses in Israel in relation to the incidence of pathogens and pests. Apidologie 42(2):192-199.
- Tapia, J; Alcazar, G; Macías, J; Contreras, F; Tapia, J; Chavoya, F; Martínez, J. 2017. Nosemosis en abejas melíferas y su relación con factores ambientales en Jalisco, México. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias 8(3):325-330.
- Tozkar, C; Kence, M; Kence, A; Huang, Q; Evans, J. 2015. Metatranscriptomic analyses of honeybee colonies. Frontiers of Genetics 6(100):1-12.
- Traver, B; Fell, R. 2011. Prevalence and infection intensity of *Nosema* in honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies in Virginia. Journal of Invertebrate Pathology 107:43-49.



Todos los derechos reservados. Universidad de Costa Rica. Este artículo se encuentra licenciado con Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Costa Rica. Para mayor información escribir a rac.cia@ucr.ac.cr

“UCR 55” VARIEDAD DE FRIJOL COMÚN MESOAMERICANO DE GRANO NEGRO

Rodolfo Araya-Villalobos¹, Néstor Felipe Chaves-Barrantes^{2/*},
Juan Carlos Hernández-Fonseca³, Carlos Cordero-Morales⁴

Palabras clave: Andisol; antracnosis; baja fertilidad; *Phaseolus vulgaris* L.

Keywords: Andisol; anthracnose; low fertility; *Phaseolus vulgaris* L.

Recibido: 04/06/2021

Aceptado: 30/08/2021

RESUMEN

Introducción. La deficiencia de fósforo (P) es una de las mayores limitantes para la producción de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), en especial en las regiones tropicales. La identificación y el uso de cultivares tolerantes es esencial para reducir los costos de producción y la dependencia de los fertilizantes para suplir las necesidades de P. **Objetivo.** Describir el proceso de desarrollo y características agronómicas de la variedad UCR 55. **Materiales y métodos.** Esta variedad provino del cruzamiento NAB 44 // ROS 24 / G 13689, realizado en el Centro Internacional de Agricultura Tropical en Colombia. Fue evaluada de 1993 al 2000, por la Universidad de Costa Rica y el Ministerio de Agricultura y Ganadería. El desempeño agronómico y características de UCR 55 se determinaron con base en la evaluación de 6 viveros, 21 ensayos, 7 parcelas de validación y 5 parcelas comerciales, llevados a cabo en 15 localidades de Costa Rica. **Resultados.** UCR 55 es una variedad de grano negro opaco, con un peso promedio de 19,4 g en 100 semillas.

ABSTRACT

“UCR 55” black-seeded Mesoamerican common bean cultivar. Introduction. Phosphorus (P) deficiency is considered one of the major constraints for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) production, in particular across the tropics. Identification and use of tolerant cultivars are essential for reducing production costs and farmers' dependence on fertilizers to overcome phosphorus deficiencies. **Objective.** To describe the process of development and the agronomic characteristics of cultivar UCR 55. **Materials and methods.** This cultivar was developed from the NAB 44 // ROS 24 / G 13689 cross made at Centro Internacional de Agricultura Tropical in Colombia. It was evaluated from 1993 to 2000, by the Universidad de Costa Rica and the Ministerio de Agricultura y Ganadería. The agronomic performance and the traits of UCR 55 were determined through 6 nurseries, 21 trials, 7 validation plots and 5 commercial plots, carried out at 15 locations in Costa Rica. **Results.** UCR 55 is a dull black-seeded cultivar, with a mean

* Autor para correspondencia. Correo electrónico: nestor.chaves@ucr.ac.cr

1 Universidad de Costa Rica, Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno (EEAFBM), Alajuela, Costa Rica.

 0000-0001-8284-5856.

2 Universidad de Costa Rica, Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno (EEAFBM), Alajuela, Costa Rica.

 0000-0001-8465-8130.

3 Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA), San José, Costa Rica.

 0000-0002-1915-3213.

4 Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA), Dirección Regional Central Sur, Puriscal, Costa Rica.

 0000-0001-9945-179X.

En condiciones experimentales en suelos andisoles, obtuvo un rendimiento mayor a 1200 kg.ha⁻¹ sin la adición de P. El rendimiento de UCR 55 en la etapa de validación fue de una media de 1336 comparado a 1000 kg.ha⁻¹ del testigo comercial Guaymí. Además, UCR 55 rindió hasta 2345 kg.ha⁻¹ en suelos volcánicos (Fraijanes) durante esta fase. UCR 55 posee una arquitectura erecta (tipo II), resistencia (valor ≤ 3) a *Colletotrichum lindemuthianum* y resistencia intermedia (valor ≤ 6) a *Pseudocercospora griseola* y a *Thanatephorus cucumeris*. **Conclusiones.** La adaptación de UCR 55 con suelos pobres en P (<10 ppm) y su resistencia a *C. lindemuthianum*, la hacen una variedad adecuada para la siembra de frijol en zonas con una altitud superior a 1000 msnm en Costa Rica.

100-seed weight of 19.4 g. Under experimental conditions in andisol soil, it yielded more than 1200 kg.ha⁻¹ without phosphorus addition. The yield of UCR 55 in the validation phase was 1336 compared to 1000 kg.ha⁻¹ for the commercial check Guaymí. In addition, this cultivar yielded up to 2345 kg.ha⁻¹ in volcanic soils during validation. UCR 55 has an erect architecture (type II), resistance (value ≤ 3) to *Colletotrichum lindemuthianum* and intermediate resistance (value ≤ 6) to *Pseudocercospora griseola* and *Thanatephorus cucumeris*. **Conclusions.** The adaptation to low P soils (<10 ppm) and its resistance to *C. lindemuthianum*, UCR 55 is a cultivar suitable for common bean production in areas over 1000 masl in Costa Rica.

INTRODUCCIÓN

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es un componente básico de la dieta en Costa Rica, donde el 97% de la población lo consume (Rodríguez-González y Fernández-Rojas 2015). Su cultivo se ubica principalmente en los cantones de La Cruz, Upala, Los Chiles, Pérez Zeledón y Buenos Aires, en un rango de altitud que varía entre los 40 y 750 msnm. Su producción está principalmente en manos de pequeños productores, con explotaciones menores a las 5 ha (Hernández-Fonseca 2009b).

Los productores de frijol enfrentan varias limitaciones que afectan el rendimiento del cultivo, entre ellas los patógenos, las condiciones climáticas adversas como exceso o ausencia de precipitaciones, y altas temperaturas y problemas edáficos. En zonas bajas e intermedias, menores a 1000 msnm, las enfermedades de origen fungoso más frecuentes y problemáticas en Costa Rica son la mancha angular, causada por *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous & Braun, y la mustia hilachosa, causada por *Thanatephorus*

cucumeris (Frank) Dong (Hernández *et al.* 1999, Araya y Hernández 2003). Sobre los 1000 msnm, en zonas más frescas, se presenta *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scrib. (antracnosis), que puede llegar a ocasionar pérdidas hasta del 100% (Rosas *et al.* 2000, Araya y Hernández 2003, Singh y Schwartz 2010). En los últimos 30 años, el nematodo *Aphelenchoides besseyi* Christie, causante del “amachamiento” se ha convertido un problema creciente en las zonas de producción (Chaves-Barrantes y Araya-Fernández 2012, Chaves *et al.* 2013). Además, las larvas de los brúquidos *Acanthoscelides obtectus* Say y *Zabrotes subfasciatus* Boheman, también pueden afectar la calidad del grano y causar pérdidas considerables (hasta 35%) durante el almacenamiento (Ishimoto y Chrispeels 1996, Miklas *et al.* 2006, Singh y Schwartz 2011).

Los suelos donde se siembra frijol en Costa Rica, son predominantemente ultisoles de baja fertilidad, con niveles de fósforo (P) menores a 10 ppm (Hernández-Fonseca 2009a). Además, en zonas con altitudes iguales o mayores a 1200 msnm, en especial hacia el este y norte

del Valle Central, en las faldas de los volcanes y algunas áreas del cantón de Coto Brus, se siembra frijol para autoconsumo y para aprovechar las podas del café (González *et al.* 1986, Araya y Zamora 1988). En estos lugares, predominan los suelos de tipo andisol, cuya arcilla alofana es capaz de fijar entre el 70 y 95% del fósforo (Alvarado *et al.* 2001).

La deficiencia de fósforo es considerada como una de las mayores limitantes para la productividad de los cultivos, en especial en los trópicos y subtrópicos (Ramaekers *et al.* 2010) y en el caso de frijol se estima que un 50% del área cultivada a nivel mundial sufre de esta problemática (Beebe *et al.* 2009). La manera más eficiente para aminorar el problema de fertilidad por bajo nivel de fósforo, es la aplicación de fertilizantes con alto contenido de este nutriente. Sin embargo, el costo económico y ambiental, supone poca viabilidad de esta opción para las condiciones de producción de los pequeños productores de frijol en los países en desarrollo (Beebe *et al.* 2006). Además, se estima que las reservas de fósforo a nivel mundial podrían acabarse en los próximos 60-80 años (Beebe *et al.* 2006).

La identificación y el uso de genotipos más eficientes en la adquisición y utilización del fósforo, es la mejor estrategia para la producción de frijol en suelos con bajos niveles de este nutriente (Beebe 2012, Assefa *et al.* 2019). También reduce la dependencia de los productores del uso de fertilizantes (Singh *et al.* 2003). La capacidad de explorar un mayor volumen de suelo en ambientes con niveles limitantes de fósforo, varía entre genotipos y es heredable (Mourice y Tryphone 2012). Los progresos

en mejoramiento genético se han logrado con genotipos que presentan mayor cantidad de raíces basales y con ángulos de inserción más rectos, mayor abundancia de raíces adventicias y mayor densidad de raíces laterales (Lynch 2019, Camilo *et al.* 2021). Recientemente se han identificado genotipos mesoamericanos de grano negro tolerantes a bajo P como SEN 56 y NCB 226 (Smith *et al.* 2019), sin embargo, en Costa Rica la investigación con énfasis en baja fertilidad data de la década de los 90. El objetivo del presente trabajo fue describir el proceso de desarrollo y las características agronómicas de la variedad UCR 55.

MATERIALES Y MÉTODOS

La línea NJBC-20601-1-CM(71V) (UCR 55) proviene del cruzamiento triple NAB 44 // ROS 24 / G 13689, realizado por el Programa de Frijol del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), en Palmira, Valle, Colombia (N 03°30', O 76°21', 965 msnm). Fue introducida a Costa Rica en mayo de 1993, en un grupo de 45 poblaciones F_2 procedentes del CIAT, para la búsqueda de tolerancia a bajo fósforo, y resistencia a *T. cucumeris* y *C. lindemuthianum*. Durante el segundo semestre de 1993, las poblaciones F_2 se sembraron en la Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno (EEAFBM) de la Universidad de Costa Rica, localizada en Alajuela, Costa Rica y otras localidades (Tabla 1). El manejo agronómico de las poblaciones no incluyó aplicación de fungicidas y con base en el método masal de una vaina por planta, se seleccionaron 67 familias F_3 .

Tabla 1. Localidades donde se evaluaron los experimentos y parcelas de validación para determinar las características agro-nómicas y potencial de rendimiento de la variedad de frijol común UCR 55 (*Phaseolus vulgaris* L.). Costa Rica. 1993 - 2000.

Localidad	Cantón	Provincia	Región	Localización geográfica	Altitud (msnm)
EEAFBM [†]	Alajuela	Alajuela	Central	N 10°00'26" O 84°15'57"	840
SEF ^{††}	Alajuela	Alajuela	Central	N 10°08'15" O 84°11'36"	1742
Cedral	Aserrí	San José	Central	N 09°49'52" O 84°08'02"	1864
Bajo Loaiza	Mora	San José	Central	N 09°49'26" O 84°14'56"	840
La Fila	Mora	San José	Central	N 09°51'50" O 84°16'21"	992
El Estero	Puriscal	San José	Central	N 09°51'42" O 84°17'29"	1005
La Legua	Puriscal	San José	Central	N 09°49'23" O 84°21'16"	1109
El Parque	Los Chiles	Alajuela	Huetar Norte	N 10°57'14" O 84°39'59"	48
Bijagua	Upala	Alajuela	Huetar Norte	N 10°43'49" O 85°03'23"	445
La Vega	San Carlos	Alajuela	Huetar Norte	N 10°25'20" O 84°31'23"	86
Tujankir	Guatuso	Alajuela	Huetar Norte	N 10°45'57" O 84°53'27"	112
Bijagual	Buenos Aires	Puntarenas	Brunca	N 09°03'37" O 83°21'07"	387
Chánguena	Buenos Aires	Puntarenas	Brunca	N 08°55'38" O 83°13'29"	462
Concepción	Buenos Aires	Puntarenas	Brunca	N 09°06'04" O 83°28'06"	540
Veracruz	Pérez Zeledón	San José	Brunca	N 09°06'00" O 83°32'37"	615

[†] Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno. Universidad de Costa Rica.

^{††} Sub Estación Fraijanes. Universidad de Costa Rica.

En el primer semestre de 1994 se evaluaron las 67 familias F_3 en El Estero de Puriscal y en el segundo semestre en la EEAFBM en Alajuela. Mediante la escogencia de una vaina por planta, se obtuvieron 375 selecciones

individuales F_4 , que fueron evaluadas en El Estero de mayo a julio de 1995. De ellas, se avanzaron 10 líneas promisorias F_5 , que no mostraron incidencia de *C. lindemuthianum* y *P. griseola* (Tabla 2).

Tabla 2. Líneas F_5 de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) seleccionadas por su resistencia a *Colletotrichum lindemuthianum* (antracnosis) y a *Pseudocercospora griseola* (mancha angular) bajo inóculo natural. Puriscal, San José, Costa Rica. Julio, 1995.

Línea	Genealogía	Color [†]
NXBC-20594-2-CM(37V)	XAN 283 // NAB 31 // G 4017 / G 19833	N Op
NHXC-20599-2-CM(64V)	XAN 283 // NAB 38 // G 4017 / G 12539	N Op
NJBC-20601-1-CM(71V)	NAB 44 // ROS 24 / G 13689	N Op
NJBC-20601-4-CM(55V)	NAB 44 // ROS 24 / G 13689	N Br
NJBC-20604-1-CM(70V)	NAB 38 // NAB 38 / G 19833	N Op
NJIC-20607-1-CM(44V)	NAB 38 / SEL1277	N Op
NJIC-20607-2-CM(62V)	NAB 38 / SEL1277	N Op
RXHI-20382-1-CM(70V)	NAB 38 / SEL1359	N Op
NJTC-20610-2-CM(58V)	MUS 130 // XAN 275 // RAB 487 / A 247	N Br
NHXC-20599-2-CM(64V)	XAN 283*(NAB 38*(G 4017*G 12539)	N Op

[†]Color del grano: N = negro; Op = opaco; Br = brillante.

En 1996 en la Sub Estación Experimental Fraijanes (SEF) de la Universidad de Costa Rica, se evaluaron las 10 líneas promisorias F_5 seleccionadas en Puriscal (Tabla 1). Se sembraron parcelas de 250 m² en un terreno con suelo andisol y sin la adición de insumos. Se seleccionó la línea NJBC-20601-1-CM(71V), por su productividad y resistencia a *C. lindemuthianum* y *P. griseola*, y se incluyó en el Ensayo Nacional de Adaptación y Rendimiento (ENAR).

Durante 1997 y 1998, la línea NJBC-20601-1-CM(71V) (UCR 55) fue evaluada en el Ensayo Nacional de Adaptación y Rendimiento (ENAR). Este experimento estuvo conformado por 16 genotipos en 1997: 12 líneas promisorias, la variedad Guaymí (Hernández-Fonseca y Araya-Villalobos 2009) como testigo nacional de grano negro, la variedad Chirripó Rojo

(Hernández-Fonseca y Araya-Villalobos 2009) como un testigo nacional de grano rojo, y 2 testigos locales, uno de grano negro y otro de grano rojo, que variaron según la localidad donde se sembró el ENAR. En 1998, se evaluaron 8 líneas promisorias, por lo que el total de genotipos evaluados fue de 12. Para el ENAR se evaluaron 10 localidades: Bijagua, Bijagual, Cháguena, Concepción, El Parque, El Estero, La Legua, La Vega, Tujankir, y Veracruz donde se sembraron un total de 17 experimentos. Se empleó un diseño de bloques completos al azar con 4 repeticiones, y la unidad experimental estuvo conformada por 6 hileras de 2,5 m de largo, separadas a 0,5 m. La reacción de las líneas de frijol del ENAR a los patógenos, fue evaluada con la escala estándar de 1 a 9 del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT); donde 1 = sin síntomas visibles

y 9 = síntomas de la enfermedad muy severos (CIAT 1987).

En 1998, UCR 55 fue evaluada en el Vivero Histórico de Frijol Común, conformado por 31 genotipos: 7 líneas promisorias introducidas, 9 variedades comerciales liberadas antes de 1990, 5 variedades nativas de uso comercial, 5 líneas promisorias UCR y 5 variedades comerciales liberadas después de 1990. Este vivero fue sembrado en la EEAFB en Alajuela, en un terreno de baja fertilidad, con alta incidencia natural *P. griseola*, *U. phaseoli*, *Chaetoseptoria* sp., *T. cucumeris* y BGYMV, e inoculado con *C. lindemuthianum*. Para evaluar la reacción de los genotipos de frijol del Vivero Histórico a los patógenos, se empleó la escala estándar (CIAT 1987).

La UCR 55 se evaluó en el Vivero para Baja Fertilidad y Factores Abióticos, conformado por 49 genotipos. Se sembró en las localidades de Fraijanes (01-06-1999) y Alajuela (06-10-1999), en 2 condiciones, con y sin adición de fósforo. En Alajuela se fertilizó con 50 kg.ha⁻¹ de P₂O₅ y en Fraijanes con 200 kg.ha⁻¹ de este fertilizante. Se empleó un diseño de látice 7x7 con 3 repeticiones. En Alajuela se sembró una hilera de 5,0 m por genotipo y en Fraijanes 2 hileras de 2,0 m y espaciadas a 0,6 m. Se inoculó 2 veces con una suspensión de conidios de *C. lindemuthianum*, (1x10⁶ conidios/ml) mientras que se trabajó con el inóculo natural de *P. griseola*, *U. phaseoli*, *Chaetoseptoria* sp. y BGYMV.

El 07 de octubre de 1999, se sembró también en la EEAFBM, Alajuela el Vivero de Líneas Avanzadas de Frijol (LINAf), conformado por 139 genotipos, incluido UCR 55, y que se evaluó bajo condiciones de baja fertilidad (suelo con <10 ppm de P, sin adición de fertilizante en un período de 5 años y con rotaciones maíz-frijol), inoculación de *C. lindemuthianum* e incidencia natural de *P. griseola*, *U. phaseoli* y *Chaetoseptoria* sp. La unidad experimental fue una hilera de 2,0 m de largo espaciada a 0,6 m, con una repetición por genotipo.

La fase de validación comercial de UCR 55 inició en mayo de 1999 y se sembraron parcelas en Concepción, El Estero, El Parque, Fraijanes y Veracruz. Este cultivar se evaluó junto con la variedad Bribri (Hernández *et al.* 2001, Rosas *et al.* 2003) y los testigos nacionales Guaymí y Chirripó Rojo. Además, entre mayo y julio del 2000 se llevó a cabo una prueba comercial, en los cantones de Puriscal, Mora y Aserrí. Para ello se sembraron parcelas de 1500 m² en las comunidades de Bajo Loaiza, Cedral, El Estero, La Fila y La Legua.

La UCR 55 fue evaluada en 15 localidades, 4 de ellas localizadas en las principales zonas de producción de frijol de Costa Rica. La altitud de los sitios de evaluación varió desde los 48 msnm en El Parque hasta los 1864 msnm en Cedral. Se cubrió todo el rango de altitud, edáfico, climático y de zonas de vida donde se ubica la producción comercial. Las áreas de siembra están localizadas en el bosque premontano muy húmedo (bmh-P) y el bosque húmedo tropical (bh-T) de acuerdo con las zonas de vida de Holdridge (1978). De 1993 al 2000, UCR 55 se incluyó en 6 viveros, 21 ensayos, 7 parcelas de validación y 5 parcelas comerciales, para determinar su resistencia a los patógenos, desempeño agronómico y potencial de rendimiento.

Los datos de rendimiento obtenidos en los distintos ensayos fueron analizados con los programas estadísticos Statistica 6.0 (StatSoft, Inc. 1984-2001) e Infostat/L (versión 2017) para determinar diferencias estadísticas a una p<0,05, mediante un análisis combinado para las distintas épocas de siembra y localidades. Mediante observaciones de campo se registró la fenología y también se hizo una descripción de las principales características morfológicas de la variedad UCR 55, según los descriptores indicados en las guías de Muñoz *et al.* (1993) y Rosas *et al.* (2009), información fundamental para distinguirla de otras variedades.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La línea NJBC-20601-1-CM(71V) ingresó en 1993 a Costa Rica como una F_2 y después de ser evaluada y avanzada en las localidades de Alajuela, Puriscal y Fraijanes. En 1996, se incluyó como F_6 en el ENAR por su productividad y resistencia a *C. lindemuthianum* y *P. griseola*, con calificación de 3 en ambos casos, de acuerdo con la escala estándar de 1 a 9, del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT 1987). En ese año, se bautizó como UCR 55, por provenir del proyecto de selección de líneas promisorias de frijol para baja fertilidad de la Universidad de Costa Rica.

En el ENAR, evaluado durante 1997 y 1998, la UCR 55 obtuvo un rendimiento promedio

de 985 kg.ha⁻¹, que no difirió de los testigos nacionales de la época, Guaymí de grano negro y Chirripó Rojo de grano rojo, ni de la variedad de grano rojo Bribri (Tabla 3), reconocida por su alto rendimiento (Hernández *et al.* 2001). El desempeño de UCR 55 en las regiones Brunca y Huétar Norte, principales regiones de producción de frijol en Costa Rica (Hernández-Fonseca 2009b), no difirieron de los testigos comerciales. Sin embargo, en la región Central, en la zona de Puriscal, UCR 55 aportó un rendimiento promedio superior a los testigos nacionales y a Bribri. Además, generó una productividad estable durante los 2 años de evaluación, en contraste con la irregularidad mostrada en las localidades de las regiones Brunca y Huétar Norte.

Tabla 3. Rendimiento promedio (kg.ha^{-1}) de la variedad de frijol común UCR 55 (*Phaseolus vulgaris* L.), comparado con los testigos nacionales de grano negro (Guaymí) y rojo (Chirripó Rojo) y la variedad de grano rojo Bribri en el Ensayo Nacional de Adaptación y Rendimiento (ENAR). Costa Rica, 1997-1998.

Región / Localidad	Época de siembra [†]	Rendimiento promedio (kg.ha^{-1}) ^{††}				
		UCR 55	Guaymí	Chirripó Rojo	Bribri	Experimento
Región Brunca						
Concepción	1997-A	1481 ab	1521 ab	1707 ab	1215 b	1524
Veracruz	1997-A	576 b	487 b	703 ab	582 b	663
Bijagual	1997-B	957 a	835 a	725 a	1047 a	872
Chánguena	1997-B	731 b	692 b	714 b	1200 a	713
Concepción	1997-B	659 a	532 a	676 a	669 a	619
Concepción	1998-A	652 c	1327 ab	1232 ab	896 bc	1094
Veracruz	1998-A	824 a	774 a	322 b	934 a	623
Bijagual	1998-B	1464 abc	1670 ab	1026 c	1248 bc	1356
Concepción	1998-B	1016 a	1114 a	764 a	695 a	910
Promedio		929 a	995 a	874 a	943 a	
Región Central						
La Legua	1997-A	1520 ab	1560 a	1301 ab	1291 ab	1328
El Estero	1997-B	1275 a	748 bc	617 c	696 c	676
El Estero	1998-A	1068 a	655 a	791 a	678 a	759
El Estero	1998-B	966 a	706 b	399 c	746 b	796
Promedio		1207 a	917 bc	777 c	853 bc	
Región Huetar Norte						
Bijagua	1997-C	487 a	553 a	633 a	528 a	535
La Vega	1997-C	1336 b	1565 a	1290 b	1512 a	1238
Tujankir	1997-C	693 a	577 a	697 a	368 a	564
El Parque	1998-C	1040 b	1318 ab	941 b	1310 ab	1178
Promedio		889 a	1003 a	890 a	930 a	
Promedio general		985 a	936 a	937 a	918 a	

[†] Época de siembra = A (May-Ago); B (Oct-Ene); C (Dic-Mar).

^{††} Para cada localidad, letras distintas indican diferencias significativas ($p<0,05$) entre promedios de rendimiento por variedad.

En el Vivero para Baja Fertilidad y Factores Abióticos sembrado en Fraijanes, UCR 55 junto con DICTA 17, A 752, y G 11640, se evidenció el mayor rendimiento de los 49 genotipos evaluados sin la adición de fósforo, mientras que el mejor genotipo fue al que se le adicionó fósforo (Tabla 4). Alajuela UCR 55, no difirió del genotipo con mayor producción al agregarse fósforo. Su

rendimiento fue igual al tercer mejor genotipo cuando no se agregó este nutriente. En todos los casos, el rendimiento de UCR 55 fue superior a la media del experimento (Tabla 4). Estos resultados demostraron la adaptación de la variedad UCR 55 a una condición de bajo fósforo y suelos volcánicos de tipo andisol como los de Fraijanes, localidad situada a una altitud de 1742 msnm.

Tabla 4. Rendimiento promedio (kg.ha^{-1}) de los mejores 10 genotipos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), en el Vivero para Baja Fertilidad y Factores Abióticos sembrado con y sin la adición de fósforo en Alajuela y Fraijanes, Costa Rica, 1999.

Nº	Fraijanes (Junio, 1999)				Alajuela (Octubre, 1999)			
	Sin fósforo		Con fósforo		Sin fósforo		Con fósforo	
Genotipo	Rend.	Genotipo	Rend.	Genotipo	Rend.	Genotipo	Rend.	
1	UCR 55	1214	UCR 55	1356	FEB 192	973	G 3513	995
2	DIRCTA 17	923	A 321	991	Carioca	939	G 17649	987
3	A 752	906	V 8025	929	FEB 190	871	G 4637	972
4	G 11640	904	Río Tibagí	927	DIRCTA 17	797	G 21212	914
5	G 13755	725	G 13755	886	UCR 55	795	G 983	898
6	G 17649	724	G 1977	844	A 483	764	Carioca	868
7	G 15047	685	G 20003	831	V 8025	761	G 15047	854
8	VAX 1	671	SEA 13	786	Compuesto Chimaltenango 2	720	VAX 1	848
9	Compuesto Chimaltenango 2	664	Negro INIFAP	766	MAR 1	703	UCR 55	844
10	CAP 4	659	MAR 1	752	MAM 38	620	G 3096	814
Promedio experimento		458		497		368		498
Dms		412		79		110		286

Durante los ENAR realizados en El Estero, el Vivero Histórico y Vivero LINAf en Alajuela, UCR 55 mostró una alta resistencia a *C. lindemuthianum* (antracnosis), y su calificación, excepto en el Vivero Histórico de 1999, fue igual o menor 3 (Tabla 5). La resistencia a ese patógeno fue evidente en el Vivero para Baja Fertilidad y Factores Abióticos, sembrado Fraijanes en 1999 (Figura 1). La antracnosis es una enfermedad común en zonas de altitud media y alta (sobre 1000

msnm) y con temperaturas frescas, de 18 a 22°C (Araya-Fernández 2009), por lo que UCR 55 se convirtió en una opción para áreas de producción con estas condiciones, usualmente situadas en la región Central de Costa Rica. Esta característica de la variedad, más su buen desempeño en condiciones de bajo fósforo, lograron explicar, los mayores rendimientos de UCR 55 en localidades alrededor o sobre los 1000 m de altura, como las de la zona de Puriscal, Alajuela y Fraijanes.

Tabla 5. Reacción de la variedad de frijol común UCR 55 (*Phaseolus vulgaris* L.) a *Colletotrichum lindemuthianum* (antracnosis), *Pseudocercospora griseola* (mancha angular) y *Thanatephorus cucumeris* (mustia hilachosa) en el Ensayo Nacional de Adaptación y Rendimiento (ENAR), el Vivero Histórico de Frijol Común y el Vivero de Líneas Avanzadas de Frijol. Costa Rica. 1997-1999.

Ensayo [†]	Localidad	Época de siembra ^{††}	Valor máximo ^{†††}			
			UCR 55	Guaymí	Chirripó Rojo	Bribri
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (antracnosis)						
ENAR	El Estero	1997-B	2	4	4	4
ENAR	El Estero	1998-B	2	2	4	3
Vivero histórico	Alajuela	1998-A	1	8	5	1
Vivero histórico	Alajuela	1999-B	4	7	6	5
Vivero LINAf	Alajuela	1999-B	3	-	-	4
<i>Pseudocercospora griseola</i> (mancha angular)						
ENAR	Bijagual	1997-B	3	4	3	4
ENAR	La Legua	1997-A	2	2	2	4
ENAR	El Estero	1997-B	5	4	6	4
ENAR	El Estero	1998-A	3	4	6	5
Vivero histórico	Alajuela	1998-A	1	5	6	6
Vivero histórico	Alajuela	1999-B	4	5	4	4
Vivero LINAf	Alajuela	1999-B	3	-	-	5
<i>Thanatephorus cucumeris</i> (mustia hilachosa)						
ENAR	Bijagual	1997-B	4	4	4	4
ENAR	Chánguena	1997-B	6	7	7	6
ENAR	Veracruz	1998-A	6	5	8	3
ENAR	El Estero	1998-A	4	4	5	4
ENAR	Bijagual	1998-B	6	6	7	6
ENAR	El Parque	1998-C	2	3	7	4

[†] Ensayo Nacional de Adaptación y Rendimiento (ENAR), Vivero Histórico de Frijol Común (Vivero histórico), Vivero de Líneas Avanzadas de Frijol (Vivero LINAf).

^{††} Época de siembra = A (May-Ago); B (Oct-Ene); C (Dic-Mar).

^{†††} Clasificación de la enfermedad (escala de 1-9) donde 1 = sin síntomas visibles y 9 = síntomas de la enfermedad muy severos (CIAT 1987).



Figura 1. Reacción de la variedad UCR 55 (*Phaseolus vulgaris* L.) a la inoculación de conidios de *Colletotrichum lindemuthianum* (antracnosis) en el vivero para baja fertilidad y factores abióticos. Fraijanes, Costa Rica. 1999.

Adicionalmente, UCR 55 presentó resistencia intermedia a *Pseudocercospora griseola* y *Thanatephorus cucumeris*, con calificaciones menores a 6 en varios experimentos. En general, UCR 55 mostró igual o menor susceptibilidad que los testigos comerciales Guaymí y Chirripó Rojo, frente a estos 2 patógenos fungosos, que son los más comunes y responsables de pérdidas en rendimiento en las principales regiones productoras de Costa Rica. Al respecto, en estudios realizados en las localidades de Isla y Medellín de Bravo, Veracruz, y Tapachula, Chiapas, en México, UCR 55 se evidencia que mostró resistencia intermedia a *P. griseola* y a *C. lindemuthianum* con una calificación de 4 y resistencia a *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger var. *appendiculatus* (roya) con una calificación de 2 (López-Salinas *et al.*

2006). El grado de resistencia a *C. lindemuthianum*, *P. griseola*, y *T. cucumeris* mostrado por UCR 55, constata que bajo condiciones climáticas normales y buenas prácticas de manejo, que incluyen el uso de semilla de calidad, mínima labranza y un uso racional de fungicidas (Chaves-Barrantes y Araya-Fernández 2014), los patógenos fungosos no deberían constituir una limitante para la obtención de buenos rendimientos con esta variedad.

El rendimiento promedio de UCR 55 durante la fase de validación, bajo el manejo del productor, fue de 1336 kg.ha⁻¹, y varió desde 620 hasta 2345 kg.ha⁻¹ (Tabla 6). Además, mostró poca adaptación en las localidades de altitudes menores a 750 msnm (Concepción, El Parque y Veracruz), donde su rendimiento fue igual o menor al testigo de grano negro Guaymí y a la

variedad de grano rojo Bribri, reconocida por su buen rendimiento en las condiciones de esas comunidades. Sin embargo, se evidenció que el rendimiento de UCR 55, en localidades con una altitud superior a los 1000 msnm, como El Estero y Fraijanes, duplicó al de Guaymí y al de Bribri, indicativo de su buena adaptación a altitudes medias o altas, y a suelos con baja disponibilidad

de fósforo. El buen rendimiento de UCR 55 en la zona de Puriscal durante 1999, se ratificó en la prueba comercial llevada a cabo en el 2000 en los cantones de Puriscal, Mora y Aserrí, donde obtuvo una producción de 883 kg.ha⁻¹ en La Legua, 1175 kg.ha⁻¹ en Cedral, 1867 kg.ha⁻¹ en Bajo Loaiza, 2162 kg.ha⁻¹ en El Estero y 2200 kg.ha⁻¹ en La Fila.

Tabla 6. Rendimiento promedio de la variedad de frijol común UCR 55 (*Phaseolus vulgaris* L.) en parcelas de validación en fincas de productores y bajo manejo comercial. Costa Rica, 1999-2000.

Localidad	Época de siembra [†]	Rendimiento promedio (kg.ha ⁻¹)			
		UCR 55	Guaymí	Chirripó Rojo	Bribri
Concepción	1999-A	620	1442	1244	900
El Estero	1999-A	1345	655	791	677
Veracruz	1999-A	824	774	322	934
El Estero	1999-B	2162	706	399	746
Concepción	1999-B	1016	1114	764	695
Fraijanes	1999-B	2345	988	941	1310
El Parque	1999-C	1040	1318	941	1310
Media general		1336	1000	772	939
Dms					472

[†] Época de siembra = A (May-Ago); B (Oct-Ene); C (Dic-Mar).

Uno de los parámetros de calidad más importantes del grano de frijol es su tiempo de cocción, y es un factor fundamental para la aceptación de una variedad por los consumidores e industriales (valor comercial), ya que representa economía en el tiempo de preparación y en la energía utilizada (Mora 1982, Pérez-Herrera *et al.* 2002, Corrêa *et al.* 2010). Al respecto, la variedad UCR 55 mantuvo un tiempo de cocción menor a 80 min durante 150 días en condiciones de temperatura ambiente en Alajuela, en un experimento que evaluó el efecto del tiempo de almacenamiento sobre la calidad del grano (Oreamuno-Fonseca 2015). UCR 55 logró mantener su grano dentro de la categoría de primera calidad durante un tiempo aproximado

de 5 meses, según el Reglamento Técnico RTCR 384:2004 Frijol en Grano (MEIC *et al.* 2005).

Con base en las condiciones en que fue evaluada y seleccionada, la variedad UCR 55 presentó un hábito de crecimiento indeterminado arbustivo (tipo II) y una arquitectura erecta y compacta. En altitudes iguales o menores a los 1100 msnm, alcanzó la floración entre los 33 y 36 días después de la siembra (dds), la madurez fisiológica entre los 65 y 70 dds, y la madurez de cosecha entre los 78 y 80 dds. En altitudes superiores a los 1700 msnm la floración se alcanzó entre los 55 y 60 dds, la madurez fisiológica entre los 91 y 99 dds, y la madurez de cosecha entre los 104 y 112 dds; debido a que la velocidad del crecimiento y desarrollo de las plantas está en función de la temperatura (Salisbury y Ross 1994, Hatfield y

Prueger 2015). Las flores de UCR 55 son moradas (Figura 2) y las vainas inmaduras verdes; además, al iniciar la maduración, las vainas adquirieron un jaspe morado en la sutura dorsal y al completarse, se tornan amarillo claro con jaspeos morados (Figura 3). En ocasiones también presentan

estrías moradas. Las vainas secas son de color crema (Figura 3). Adicionalmente se identificó que el promedio de semillas por vaina es de 6, con forma ovoide y color negro opaco al secarse (Figura 2). El peso promedio de 100 semillas fue de 19,4 g (al 14% de humedad).

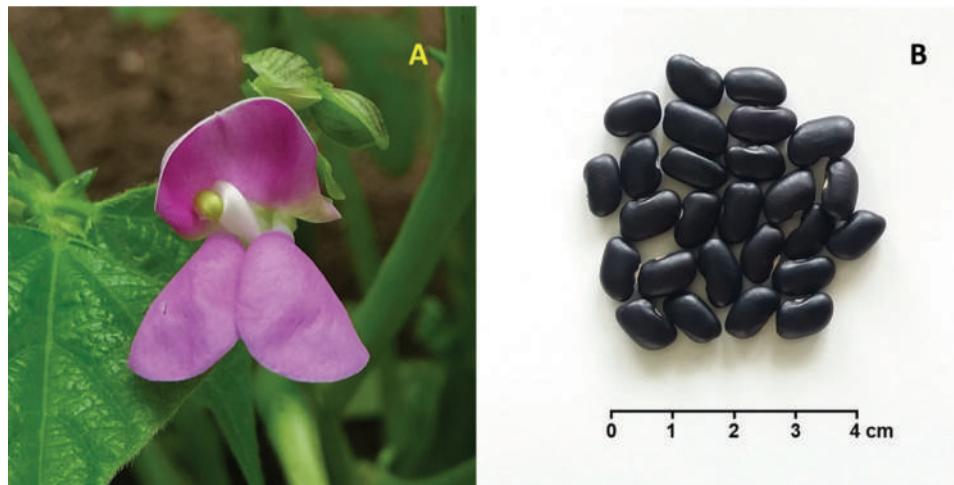


Figura 2. Variedad UCR 55 (*Phaseolus vulgaris* L.). (A) Flor, (B) Semillas, Costa Rica, 2021.



Figura 3. Variedad UCR 55 (*Phaseolus vulgaris* L.). (A) Vainas en inicio de madurez fisiológica, (B) Al completar la madurez, (C) Punto de cosecha. Costa Rica, 2021.

A pesar de que la evaluación de la variedad UCR 55 finalizó en el 2000 con las pruebas comerciales, y ya han pasado más de 20 años desde las investigaciones, se identificó como el único cultivar con buena adaptación a suelos con bajo P y resistencia a *C. lindemuthianum* del que disponen los productores costarricenses. Las demás variedades de grano negro que se utilizan en la actualidad, como Brunca, Guaymí, Matambú y Nambí no fueron generadas para enfrentar esta limitante edáfica.

Semilla de la variedad UCR 55 puede ser obtenida en la Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno (EEAFBM) de la UCR.

RECONOCIMIENTO

La variedad UCR 55 es producto del trabajo conjunto entre la Universidad de Costa Rica (UCR) y el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) de Costa Rica, en colaboración con Programa de Frijol del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) en Colombia.

AGRADECIMIENTOS

La investigación que dio origen a UCR 55 fue financiada por la Universidad de Costa Rica (proyecto 736-91-315, inscrito en la Vicerrectoría de Investigación), y por el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) de Costa Rica. También recibió financiamiento parcial del Programa Cooperativo Regional de Frijol de Centroamérica, México y El Caribe (PROFRIJOL). Se agradece el apoyo del PhD. Stephen E. Beebe del Programa de Frijol del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), en la generación de la variedad UCR 55.

LITERATURA CITADA

- Alvarado, A; Bertsch, F; Bornemisza, E; Cabalceta, G; Forsythe, W; Henríquez, C; Mata, R; Molina, E; Salas, R. 2001. Suelos derivados de cenizas volcánica (Andisoles) de Costa Rica. San José, Costa Rica, Asociación Costarricense de la Ciencia del Suelo. 111 p.
- Araya-Fernández, CM. 2009. Enfermedades y su combate. In *Cultivo de frijol (Phaseolus vulgaris)*. Manual de recomendaciones técnicas para el cultivo de frijol. Hernández, JC; Ramírez, L (eds.). San José, Costa Rica, Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA). p. 63-72.
- Araya, C; Hernández, JC. 2003. Distribución agroecológica de enfermedades del frijol en Costa Rica. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología 68:26-33.
- Araya, R; Zamora, A. 1988. Efecto del frijol común sobre la productividad del cafeto podado y en formación. Agronomía Costarricense 13(1):93-97.
- Assefa, T; Assibi-Mahama, A; Brown, AV; Cannon, EKS; Rubyogo, JC; Rao, IM; Blair, MW; Cannon, SB. 2019. A review of breeding objectives, genomic resources, and marker-assisted methods in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Molecular Breeding 39:20. DOI: 10.1007/s11032-018-0920-0.
- Beebe, SE. 2012. Common bean breeding in the tropics. Plant Breeding Reviews 36(1):357-426.
- Beebe, S; Rao, I; Blair, MW; Butare, L. 2009. Breeding for abiotic stress tolerance in common bean: present and future challenges. Paper presented at: 14th Australian Plant Breeding and 11th Society for Advancement of Breeding Research in Asia and Oceania (SABRAO), Brisbane, Australia. 10-14 Aug. s.p.
- Beebe, SE; Rojas-Pierce, M; Yan, X; Blair, MW; Pedraza, F; Muñoz, F; Tohme, J; Lynch, JP. 2006. Quantitative trait loci for root architecture traits correlated with phosphorus acquisition in common bean. Crop Science 46:413-423. DOI: 10.2135/cropsci2005.0226.
- Camilo, S; Odindo, AO; Kondwakwenda, A; Sibya, J. 2021. Root traits related with drought and phosphorus tolerance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Agronomy 11, 552. DOI: 10.3390/agronomy11030552.
- Chaves-Barrantes, NF; Araya-Fernández, CM. 2012. Pérdidas causadas por el amachamiento del frijol (*Aphelenchoïdes besseyi* Christie) y reacción del germoplasma comercial al patógeno. Agronomía Mesoamericana 23(1):01-12. DOI: 10.15517/AM.V23I1.2013.
- Chaves-Barrantes, NF; Araya-Fernández, CM. 2014. Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) en el Cultivo de Frijol. Heredia, Costa Rica, Editorial de la Universidad Nacional (EUNA). 129 p.
- Chaves, N; Cervantes, E; Zabalgogeazcoa, I; Araya, CM. 2013. *Aphelenchoïdes besseyi* Christie (Nematoda: Aphelenchoididae), agente causal del amachamiento del frijol común. Tropical Plant Pathology 38(3):243-252.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1987. Sistema estándar para la evaluación de germoplasma

- de frijol. In Von Schoonhoven, A; Pastor-Corrales, M (eds.). Cali, Colombia, CIAT. 56 p.
- Corrêa, MM; De Carvalho, LMJ; Nutti, MR; De Carvalho, JLV; Neto, ARH; Ribeiro, EMG. 2010. Water absorption, hard shell and cooking time of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). African Journal of Food Science and Technology 1:13-20.
- González, W; Gutiérrez, R; Araya, R. 1986. Análisis económico de la asociación cafeto (*Coffea arábica* L.) frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en cafetales con poda sistémica. Boletín Técnico Estación Experimental Fabio Baudrit M. 19(3):1-9.
- Hatfield, JL; Prueger, JH. 2015. Temperature extremes: Effect on plant growth and development. Weather and Climate Extremes 10(A):4-10. DOI: 10.1016/j.wace.2015.08.001.
- Hernández-Fonseca, JC. 2009a. Clima y suelos. In Cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris*). Manual de recomendaciones técnicas para el cultivo de frijol. Hernández, JC; Ramírez, L (eds.). San José, Costa Rica, Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA). p. 17.
- Hernández-Fonseca, JC. 2009b. Zonas de cultivo y épocas de siembra. In Cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris*). Manual de recomendaciones técnicas para el cultivo de frijol. Hernández, JC; Ramírez, L (eds.). San José, Costa Rica, Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA). p. 18.
- Hernández-Fonseca, JC; Araya-Villalobos, R. 2009. Cultivo. In Cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris*). Manual de recomendaciones técnicas para el cultivo de frijol. Hernández, JC; Ramírez, L (eds.). San José, Costa Rica, Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA). p. 19-26.
- Hernández, JC; Araya, R; González, W. 1999. Diagnóstico de la actividad productiva del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en la región Brunca de Costa Rica: cosecha 1995-1996. Agronomía Mesoamericana 10(2):75-84. DOI: 10.15517/AM.V10I2.17946.
- Hernández, JC; Araya, R; Morales, A. 2001. Bribí, nueva variedad de frijol rojo pequeño para Costa Rica. Agronomía Mesoamericana 12(1):15-23. DOI: 10.15517/AM.V12I1.17242.
- Holdridge, LR. 1978. Ecología basada en zonas de vida. San José, Costa Rica, IICA. 216 p.
- Ishimoto, M; Chrispeels, MJ. 1996. Protective mechanism of the Mexican bean weevil against high levels of a-amylase inhibitor in the common bean. Plant Physiology 111:393-401.
- López-Salinas, E; Tosquy-Valley, OH; Villar-Sánchez, B; Becerra-Leor, EN; Ugalde-Acosta, FJ; Cumplán-Gutiérrez, J. 2006. Adaptabilidad de genotipos de frijol resistentes a enfermedades y suelos ácidos. Revista de Fitotecnia Mexicana 29(1):33-39.
- Lynch, JP. 2019. Root phenotypes for improved nutrient capture: An underexploited opportunity for global agriculture. New Phytologist 223(2):548-564. DOI: 10.1111/nph.15738.
- Miklas, PN; Kelly, JD; Beebe, SE; Blair, MW. 2006. Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical to MAS breeding. Euphytica 147:105-131. DOI: 10.1007/s10681-006-4600-5.
- MEIC (Ministerio de Economía, Industria y Comercio), Ministerio de Salud, MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería). 2005. Decreto Ejecutivo N° 32149-MEIC-S-MAG. Reglamento Técnico RTCR 384:2004 Frijol en Grano. Diario oficial La Gaceta N°. 3 del 05 de enero del 2005.
- Mora, M. 1982. Influencia de diferentes temperaturas y contenidos de humedad sobre el tiempo de cocción de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) almacenado durante 18 meses. Agronomía Costarricense 6(1/2):87-89.
- Mourice, SK; Tryphone, GM. 2012. Evaluation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes for adaptation to low phosphorus. International Scholarly Research Network Agronomy, 309614:1-9. DOI:10.5402/2012/309614.
- Muñoz, G; Giraldo, G; De Soto, JF. 1993. Descriptores varietales: arroz, frijol, maíz, sorgo. Cali, Colombia, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 174 p.
- Oreamuno-Fonseca, P. 2015. Efecto de las altas temperaturas en el campo, el momento de cosecha y el almacenamiento tradicional sobre el tiempo de cocción y la imbibición de los granos de variedades de frijol común. Tesis MSc. San Pedro, Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 108 p.
- Pérez-Herrera, P; Esquivel-Esquivel, G; Rosales-Serna, R; Acosta-Gallegos, JA. 2002. Caracterización física, culinaria y nutricional de frijol del altiplano subhúmedo de México. Archivos Latinoamericanos de Nutrición 52:172-180.
- Ramaekers, L; Remans, R; Rao, IM; Blair, MW; Vanderleyden, J. 2010. Strategies for improving phosphorus acquisition efficiency of crop plants. Field Crops Research 117:169-176.
- Rodríguez-González, S; Fernández-Rojas, SE. 2015. Prácticas culinarias asociadas al consumo de frijoles en familias costarricenses. Agronomía Mesoamericana 26(1):145-151. DOI: 10.15517/am.v26i1.16937.
- Rosas, JC; Castro, A; Flores, E. 2000. Mejoramiento genético del frijol rojo y negro mesoamericano para Centroamérica y el Caribe. Agronomía Mesoamericana 11(2):37-46. DOI: 10.15517/AM.V11I2.17305.

- Rosas, JC; Guachambala, M; Ramos, RA. 2009. Guía ilustrada para la descripción de las características de variedades del frijol común. Honduras, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. 22 p.
- Rosas, JC; Hernández, JC; Araya, R. 2003. Registration of 'Bribri' Small Red Bean (Race Mesoamerica). *Crop Science* 43(1):430-431.
- Salisbury, FB; Ross, CW. 1994. *Fisiología vegetal*. México, Grupo Editorial Iberoamérica. 759 p.
- Singh, SP; Schwartz, HF. 2010. Breeding common bean for resistance to diseases: a review. *Crop Science* 50:2199-2223.
- Singh, SP; Schwartz, HF. 2011. Breeding common bean for resistance to insect pest and nematodes. *Canadian Journal of Plant Science* 91(2):239-250. DOI:10.4141/CJPS10002.
- Singh, SP; Terán, H; Muñoz, CG; Osorno, JM; Takegami, JC; Thung, MD. 2003. Low soil fertility tolerance in landraces and improved common bean genotypes. *Crop Science* 43:110-119. DOI:10.2135/cropsci2003.0110.
- Smith, MR; Veneklaas, E; Polania, J; Rao, IM; Beebe, SE; Merchant, A. 2019. Field drought conditions impact yield but not nutritional quality of the seed in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *PLoS ONE* 14(6):e0217099. DOI:10.1371/journal.pone.0217099.



Todos los derechos reservados. Universidad de Costa Rica. Este artículo se encuentra licenciado con Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Costa Rica. Para mayor información escribir a rac.cia@ucr.ac.cr

FLUJOS DE ÓXIDO NITROSO EN PASTURAS BAJO DIFERENTES DOSIS DE FERTILIZACIÓN NITROGENADA, NORTE DE COLOMBIA*

*José Luis Contreras-Santos^{1/**}, Manuel Ramón Espinosa-Carvajal², Jorge Cadena-Torres³, Judith Martínez-Atencio⁴, Cindy Katherine Falla-Guzmán⁵, Jeyson Fernando Garrido-Pineda⁶*

Palabras clave: Gases de efecto invernadero (GEI); mitigación; gramínea; propiedades físico-químicas suelo; producción ganadera.

Keywords: Greenhouse gas; mitigation; grass; physical-chemical properties of soil; livestock-bovine.

Recibido: 28/07/2021

Aceptado: 24/08/2021

RESUMEN

Introducción. El óxido nitroso es un gas de efecto invernadero de gran impacto sobre el calentamiento global. En los sistemas de producción ganaderos es de gran importancia buscar alternativas que permitan mitigar las emisiones de N_2O , dentro de las cuales se ha considerado el uso de coberturas vegetales capaces de reducir el proceso de nitrificación. **Objetivo.** Evaluar la dinámica de los flujos de N_2O en suelos bajo ocupación ganadera cubiertos con gramíneas mejoradas y fertilización nitrogenada (Úrea). **Materiales y métodos.** Esta investigación se desarrolló en un sistema de producción de carne en el valle medio del Río Sinú, en el cual los flujos de N_2O fueron monitoreados durante un

ABSTRACT

Nitrous oxide fluxes in pastures under different dose of nitrogen fertilization, Northern Colombia. **Introduction.** Nitrous oxide is a highly relevant greenhouse gas. In livestock production systems, it is of a great importance to search for alternatives to mitigate N_2O emissions, among which the use of plant covers capable of reducing nitrification process has been considered. **Objective.** Evaluate the dynamics of N_2O fluxes in livestock soils covered with two improved grasses and doses of nitrogen fertilization (Urea). **Materials and methods.** This research was developed in a livestock system in the middle valley of the Río Sinú, in which N_2O fluxes were monitored during

* Resultados derivados de proyecto de investigación “Producción intensiva de carne en pastos con diferente capacidad para inhibir la nitrificación y reducir las emisiones de gases de efecto invernadero”, financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR) y la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Agrosavia).

** Autor para correspondencia. Correo electrónico: jlcontreras@agrosavia.co

1 Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), C.I Turipaná, Colombia.

 0000-0002-8179-3430.

2 Corporación Colombiana De Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), C.I Turipaná, Colombia Sede Carmen De Bolívar.

 0000-0001-8939-5472.

3 Corporación Colombiana De Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), C.I Turipaná, Colombia.

 0000-0002-5180-2893.

4 Corporación Colombiana De Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), C.I Turipaná, Colombia.

 0000-0002-8275-2956.

5 Corporación Colombiana De Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), C.I Turipaná, Colombia.

 0000-0002-1266-8505.

6 Corporación Colombiana De Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), C.I Turipaná, Colombia.

 0000-0002-1405-1066.

periodo de 12 meses (noviembre 2014 - 2015). Se utilizó un diseño experimental de bloques completos al azar, en arreglo de parcelas divididas y 2 repeticiones, en donde la parcela principal correspondió a las gramíneas (*Brachiaria humidicola* CIAT679 y *Panicum maximum* cv. Tanzania) y suelo descubierto, y las subparcelas a 3 dosis de fertilización nitrogenada (0, 150, 300 kg.ha⁻¹.año⁻¹ N). **Resultados.** Los flujos de N₂O fluctuaron según el contenido de humedad del suelo, asociado a los períodos de mayor o menor precipitación en la región. La cobertura con la gramínea *Brachiaria humidicola* cv CIAT679 mostró menores emisiones de N₂O, mientras que las dosis de fertilizantes nitrogenados aumentaron las emisiones de N₂O. Dichos efectos fueron en parte atenuados por el uso de la cobertura con *Brachiaria humidicola* CIAT679. **Conclusiones.** Los resultados obtenidos indican que las emisiones de óxido nitroso en los sistemas ganaderos podrían variar a partir del tipo de cobertura y las dosis de fertilización nitrogenada utilizadas. En este caso, se encontró que la cobertura con *Brachiaria humidicola* cv CIAT679 en los sistemas de producción ganaderos reduce en más del 40% las emisiones de óxido nitroso hasta una dosis de N máxima de 300 kg.ha⁻¹.año⁻¹.

a period of 12 months (November 2014 - 2015). An experimental design of randomized complete block design was used, in an arrangement of divided plots and 2 repetitions, where main plot corresponded to grasses (*Brachiaria humidicola* CIAT679 and *Panicum maximum* cv. Tanzania) and bare soil; and the subplots fertilization dose of N (0, 150, 300 kg.ha⁻¹.year⁻¹ N). **Results.** The N₂O fluxes fluctuated according to the soil moisture content, associated with periods of great or less precipitation in the region. Coverage with the grass *Brachiaria humidicola* cv CIAT679 showed lower N₂O emissions, while the doses of nitrogen fertilizers increased N₂O emissions. These effects were partially attenuated by the use of the coverage with *Brachiaria humidicola* CIAT679. **Conclusions.** The results obtained indicate that nitrous oxide emissions in livestock systems could vary from the type of coverage and the doses of nitrogen fertilizer used. In our case, it was found that coverage with *Brachiaria humidicola* CIAT679 in livestock production systems reduces nitrous oxide emissions by more than 40% with maximum N soil application of 300 kg.ha⁻¹.year⁻¹.

INTRODUCCIÓN

Los sistemas de producción ganaderos, asociados al uso de pradera sin arboles son un ecosistema terrestre de gran importancia, que ocupa casi la cuarta parte de la superficie terrestre (Clough *et al.* 2020). La creciente demanda de alimento ha aumentado en las últimas décadas, relacionado con el crecimiento demográfico, lo cual ha llevado a la conversión de áreas boscosas en sistemas de producción agropecuarios (FAO y GTIS 2015).

Estos sistemas son altamente dependientes de fertilizantes nitrogenados (N) sintéticos, esenciales para la maximización de la productividad

(Lam *et al.* 2018). Sin embargo, las plantas rara vez son capaces de asimilar más del 50% del fertilizante nitrogenado aplicado, con la pérdida de N del sistema suelo – planta, por medio de la lixiviación, volatilización, nitrificación y desnitrificación, que representa una fuente directa de emisiones de gases de efecto invernadero como el óxido nitroso – N₂O (Cameron *et al.* 2013). Este es uno de los gases de efecto invernadero que, en las últimas décadas, registra las mayores tasas de acumulación en la atmósfera (Herrero *et al.* 2016), reportado además, como uno de los de mayor permanencia o duración (>100 años), con potencial de calentamiento global (PCG), 310 veces mayor que el del dióxido de carbono (CO₂)

(Gao *et al.* 2014, Byrnes *et al.* 2017, Liang *et al.* 2018). Se considera que el N₂O es la sustancia que más agota o degrada la capa de ozono, por lo que se le ha dado mayor relevancia en estudios sobre su mitigación (Ravishankara *et al.* 2009, CATIE 2015).

Las actividades antrópicas, relacionadas con el uso en los sistemas agropecuarios de los fertilizantes nitrogenados (N), se considera que promueven las emisiones de N₂O hacia la atmósfera, lo cual se relaciona con los procesos de nitrificación y desnitrificación que ocurren continuamente en los suelos (González-Estrada y Camacho-Amador 2017). Se ha reportado que la entrada de fertilizantes nitrogenados estimula estos procesos, lo que genera a su vez un aumento de las tasas de emisión de N₂O (Erickson *et al.* 2001, Butterbach Bahl *et al.* 2013).

De acuerdo con el inventario nacional de gases de efecto invernadero realizado en Colombia, se indica que el 26% de las emisiones del país se relacionan con actividades del sector agropecuario, ya que representa un total de 67,3 Mton CO₂ eq.año⁻¹, de las cuales el 12,7% (8,55 Mton CO₂ eq) están relacionadas con las emisiones ocasionadas por el sector pecuario (orina y estiércol de animales en pastoreo), seguido por la aplicación de fertilizantes nitrogenados sintéticos (2,6%; 1,75 Mton CO₂ eq.año⁻¹) y la gestión de suelos orgánicos drenados (2,1%; 1,41 Mton CO₂ eq.año⁻¹), entre otros (Pulido *et al.* 2016, Torres, 2020). Diversas investigaciones han demostrado que el uso y manejo del nitrógeno en los sistemas de producción agropecuario es uno de los factores de mayor impacto en la emisión de gases de efecto invernadero (GEI) (Dalal *et al.* 2003, Bodelier y Laanbroek 2004, LeBauer y Treseder 2008). Asimismo, se ha demostrado con respecto al flujo biogénico de gases de efecto invernadero (GEI) que la magnitud y dirección de los flujos puede variar entre ecosistemas, debido a las condiciones ambientales específicas del hábitat, variaciones en la humedad del suelo y el tipo de cubierta vegetal (Neff *et al.* 1994, Gulledge y Schimel 2000). Debido al creciente uso de fertilizantes nitrogenados en

la producción ganadera en el valle del Sinú, se consideró de gran importancia evaluar los flujos de N₂O en diferentes tipos de cobertura de pasturas, frente a las distintas dosis de fertilizante nitrogenado (N).

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio experimental. La investigación se realizó durante un periodo de 365 días consecutivos, con toma de información mensual de los flujos de N₂O en un sistema ganadero de producción de carne, entre noviembre 2014 a noviembre 2015, bajo las condiciones del centro de investigación Turipaná, perteneciente a la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – AGROSAVIA. Este centro se encuentra localizado al norte de Colombia en la subregión Valle del Sinú municipio de Cereté – Córdoba, con coordenadas geográficas 8°51'3,9" N y 75°48'3,3" W. El centro de investigación se encuentra a 15 msnm, temperatura promedio 28°C, precipitación acumulativa anual de 1200 a 1300 mm.año⁻¹ y humedad relativa promedio año 82%. Las precipitaciones en la región del valle medio del río Sinú presenta comportamiento bimodal, con 2 períodos bien definidos, uno lluvioso comprendido entre abril y noviembre, y otro seco entre diciembre y marzo. Las condiciones agroecológicas predominantes son las de Bosque seco tropical (Bs T), descrita por Holdridge (2000).

El área de estudio posee suelos de planicie, correspondiente a tierras bajas, en las cuales el material de origen es sedimentario, con texturas finas. El drenaje natural es imperfecto en las áreas más altas y pobre en las áreas más bajas. Los grupos texturales predominantes son franco-arcilloso, franco-limoso y franco-arcillo-limoso, con mayor presencia del primer grupo textural. El suelo bajo estudio correspondió a un Vertic Endoaquepts (Soil Survey Staff 2014), el cual presenta un régimen de humedad údico y temperatura isohipertérmico, con secuencia de horizontes Ap, Bx, Bg y Cg.

Tratamientos. La investigación se realizó en un área que por años ha estado bajo producción ganadera. Se seleccionaron 12 ha, las cuales presentaban potreros con las pasturas *Brachiaria humidicola* cv. CIAT679 y *Panicum maximum* cv. Tanzania. Se utilizó un diseño experimental de parcelas divididas con 2 repeticiones, en donde las parcelas principales correspondieron a las coberturas con gramíneas (PP) y las subparcelas (SP) a las dosis de fertilización nitrogenada (0, 150 y 300 kg.ha⁻¹.año⁻¹), aleatorizadas dentro de las PP. Para la fuente de nitrógeno utilizada fue la Urea ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$), con una concentración de 46% de N. Las aplicaciones de N se realizaron al voleo, en forma superficial, en 3 aplicaciones

fraccionadas de la dosis total, las cuales se realizaron bajo condiciones de suelo húmedo, según el comportamiento de las precipitaciones en la región. La primera aplicación del fertilizante nitrogenado se realizó en noviembre, al final de la temporada anual de lluvias, la segunda aplicación se realizó en abril, al inicio de la temporada de lluvias del siguiente año, y la tercera aplicación se realizó al terminarse la época denominada veranillo de San Juan, a mediados de agosto. A lado de cada parcela principal se dejaron áreas de terreno con suelo descubierto. Como testigo absoluto, sobre las cuales se realizaron las aplicaciones de N en las mismas dosis y forma de aplicación que las anteriores (Tabla 1).

Tabla 1. Tratamientos de fertilización nitrogenada implementados para monitorear las emisiones de N_2O en suelos bajo producción ganadera.
Valle Medio del Sinú, Colombia.

Cobertura (PP)	Dosis de Nitrógeno (UREA, $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) kg.ha ⁻¹ .año ⁻¹ (SP)	Tratamientos
	0	Bh_0
<i>Brachiaria humidicola</i> cv. CIAT679	150	Bh_150
	300	Bh_300
	0	Pm_0
<i>Panicum maximum</i> cv. Tanzania	150	Pm_150
	300	Pm_300
	0	Sd_0
Suelo descubierto	150	Sd_150
	300	Sd_300

Con el anterior arreglo experimental, las PP quedaron conformadas por un área de 3 ha y las SP por un área de 1 ha. Las parcelas con suelo descubierto tuvieron un área de 0,3 ha a manera de PP y la SP de 0,1 ha.

Variables evaluadas

Ambientales. Se realizó el registro de variables ambientales como la precipitación (mm.mes⁻¹), temperaturas máxima, mínima,

media diaria (°C) y humedad relativa media (%) durante los 12 meses de evaluación, mediante la instalación de una estación climatológica (Vantage Pro2 Plus Fan, Davis Instruments), en un área anexa al experimento (Tabla 2). Los registros de las variables ambientales indicaron que, el 58% de las evaluaciones de los flujos de N_2O se realizaron bajo condiciones de época seca, con precipitaciones mensuales inferiores a los 100 mm.mes⁻¹ (Tabla 2).

Tabla 2. Comportamiento de algunas variables ambientales en el área de estudio durante el periodo de evaluación de flujos de N₂O.

Mes	T max (°C)	T min (°C)	T med (°C)	HR (%)	P (mm.mes ⁻¹)
nov-14	32,91	24,07	28,49	74,00	31,10
dic-14	33,26	24,15	28,70	75,95	67,00
ene-15	34,36	22,87	28,62	67,61	0,40
feb-15	34,99	23,77	29,38	66,35	9,30
mar-15	35,64	24,13	29,89	63,31	0,00
abr-15	34,89	24,74	29,82	70,57	141,60
may-15	33,60	24,46	29,03	75,06	217,20
jun-15	34,67	25,11	29,89	72,00	39,20
jul-15	33,81	24,31	29,06	75,24	220,80
ago-15	33,90	24,47	29,18	76,26	87,80
sep-15	33,35	24,63	28,99	79,59	91,00
oct-15	32,78	24,07	28,42	79,26	208,00
nov-15	32,22	24,45	28,34	81,13	135,60

Tmax = Temperatura máxima (°C); Tmin = Temperatura mínima (°C); Tmed = Temperatura media (°C); HR = Humedad Relativa (%); P = Precipitación (mm).

Propiedades de los suelos. Para la determinación de las propiedades físicas del sitio experimental, se tomaron muestras al inicio y al final del experimento en cada subparcela, a una profundidad de 0,20 m. La determinación de la densidad aparente (Da) se realizó mediante el método del cilindro de volumen conocido (98,17 cm⁻³): Da = MSS/Vc, donde MSS = masa de suelo seco (g) a 105°C por 24hr y Vc = volumen del cilindro (cm³) (Burt 2014); la densidad real (Dr) mediante el método del picnómetro (Burt 2014); la porosidad total (Pt) mediante la relación Pt = (1- (Da/Dr)) x 100 (Bernabé y Maineult 2015); la textura por el método de Bouyoucos y la estabilidad de agregados mediante el método del yoder modificado. El porcentaje de la porosidad ocupada por agua (water filled porosity space, WFPS) se determinó con la metodología

utilizada por Contreras-Santos *et al.* (2021), mediante la relación:

$$WFPS = (Hum \times Da / Pt) \times 100$$

Donde

Hum = humedad gravimétrica (g.g⁻¹)

Da = densidad aparente (g.cm⁻³)

Pt = porosidad total (g.g⁻¹)

Todos los análisis físicos se realizaron a partir de los protocolos establecidos por IGAC (2006).

Para la determinación de las propiedades químicas del sitio experimental, se colectaron muestras por triplicado a una profundidad de 0,20 m, en cada una de las subparcelas, las cuales se homogenizaron para obtener 1 kg de suelo por subparcela. Las muestras fueron analizadas en

el laboratorio de Química Analítica de AGRO-SAVIA, con base a las metodologías propuestas por IGAC (2006). La reacción del suelo o pH, se determinó mediante el método potenciométrico, con relación 1:1 Peso/Volumen (Hendershot *et al.* 2007), Norma Técnica Colombiana – NTC 5264, materia orgánica (MO, %) por oxidación Walkley – Black (Nelson y Sommers 1983), fósforo (P, mg.kg⁻¹) por extracción Bray II modificado y cuantificación por reducción con ácido ascórbico (Bray y Kurtz 1945), Azufre (S, mg.kg⁻¹) extracción con monofosfato de calcio 0,008 M y cuantificación turbidimétrica, potasio; Calcio; Magnesio y sodio (K; Ca; Mg; Na, cmol(+).kg⁻¹) por medio espectrofotometría de absorción y emisión atómica (Hendershot *et al.* 2007, Chapman 2016), Norma Técnica Colombiana – NTC 5349, Hierro; Manganeso; Zinc y Cobre (Fe; Mn; Zn; Cu, mg.kg⁻¹) se determinaron por medio del método de Olsen modificado espectrofotometría y cuantificación por absorción atómica (NTC 5526:2007) y Boro (B, mg.kg⁻¹) extracción con fosfato monobásico de calcio – Azometina H (NTC 5404), se realizó análisis de salinidad y alcalinidad del suelo (Bases solubles: Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, K⁺ y Na⁺); Sulfatos (SO₄); Cloruros (Cl⁻) y bicarbonatos (HCO₃⁻) siguiendo la metodología descrita por IGAC (2006).

Flujos de óxido nitroso (N₂O). Los flujos de N₂O se realizaron con la metodología de cámara cerrada estática de PVC descrita por Espinosa-Carvajal *et al.* (2020). La cámara constaba de 2 cilindros de PVC, de 25 cm de diámetro, unidos por medio de una banda elástica de caucho (polímero elástico). El cilindro inferior abierto por ambas caras y biselado en uno de sus lados tenía una altura total de 7,5 cm, el cual se insertó en el suelo 24 horas antes de iniciar el proceso de evaluación, a una profundidad de 5,5 cm. El cilindro superior tenía una altura de 10 cm y en este caso, se instalaba al momento de iniciar las evaluaciones de flujos de N₂O. Este cilindro estaba cerrado por una de sus caras (superior), con la finalidad de asegurar hermetismo dentro de la cámara (microclima), con 2 agujeros

tapados con material de goma, uno para introducir el termómetro para evaluar temperatura interna de la cámara y otro para tomar la muestra de gases. Las cámaras se instalaron por triplicado en cada una de las parcelas experimentales.

Las determinaciones de los flujos de N₂O se realizaron a las 10:00 am, para muestras de 20 mL del aire dentro de la cámara a los 0 (antes de cerrar la cámara), 15, 30 y 45 min después de cerrada la cámara. De las muestras obtenidas con jeringa se descartaron los primeros 5 mL y el resto fue depositado en viales al vacío con capacidad de 15 mL. Las muestras fueron rotuladas, selladas y almacenadas a temperatura ambiente bajo condiciones de oscuridad (Rondon, 2000). Las muestras fueron enviadas al laboratorio de servicios ambientales del Centro Internacional de Agricultura Tropical - CIAT (Palmira, Colombia), en donde se determinaron en cada tratamiento, las concentraciones de N₂O a los tiempos 0, 15, 30 y 45 min después de cerrada la cámara, mediante cromatografía de gases.

Los flujos de N₂O se calcularon en función del área y tiempo, mediante la siguiente relación (Capa 2015):

$$F = \frac{dx}{dt} \times \frac{V \times M}{A \times Vm}$$

Donde

F	= flujo de N ₂ O (μg N-N ₂ O m ⁻² hr ⁻¹)
dx/dt	= pendiente de la variación de las lecturas, a los tiempos 0, 15, 30 y 45 min después de cerrada la cámara (ppm min ⁻¹)
V	= volumen ocupado por el gas (L)
M	= masa molar de N por cada Mol de N ₂ O
A	= área de la cámara (m ²)
Vm	= volumen molar del gas

Para obtener dx/dt se ajustaron modelos de regresión lineales para cada cámara y muestreo realizado, para lo cual se consideraron ajustes con R²>0,90 y p<0,05.

Análisis estadístico. Se realizaron análisis de varianza para comparar los flujos N₂O

entre tratamientos, con un nivel de significancia $\alpha=0,05$, junto con modelos lineales generales mixtos. Para evaluar el cumplimiento de los requisitos de normalidad y homogeneidad se utilizaron gráficos de gg, histogramas y gráficos de cajas de residuos. La homogeneidad se evaluó mediante gráficos de residuos versus datos esperados. Se seleccionó el modelo con el menor Akaike (AIC) y criterio de información bayesiano (BIC) y la máxima relación de probabilidad de registro. Para realizar la comparación de medias entre tratamientos, se utilizó la prueba HSD de Tukey y contrastes ortogonales para comparar combinaciones entre tratamientos. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el programa estadístico SAS Enterprise Guide 8.3. Las variables ambientales y edáficas se sometieron a un análisis de correlación de Pearson y componentes principales mediante el procedimiento PROC FACTOR, que determinaron la asociación de variables frente a los flujos N₂O.

RESULTADOS

Propiedades del suelo. Los resultados mostraron que las propiedades físicas y químicas del suelo antes y después de concluido el período experimental eran similares ($p>0,05$) entre tratamientos. La densidad aparente presentó un promedio general de $1,10\pm0,07\text{ g.cm}^{-3}$, los valores de porosidad total estuvieron alrededor del 50%. El pH mostró una media general de $6,55\pm0,28$; el contenido de materia orgánica (MO) expuso valores superiores a 3%, el contenido de azufre (S) presentó valor medio de $24,48\pm26,99\text{ mg.kg}^{-1}$, el fosforo intercambiable (P), presentó valores inferiores a 20 mg.kg^{-1} , el contenido de bases de intercambio (calcio, magnesio y potasio), mostró valores promedios de $13,08\pm2,77$, $12,21\pm1,85$ y $0,69\pm0,36\text{ cmol.kg}^{-1}$, respectivamente. Los microelementos (hierro, cobre, zinc y manganeso) mostraron valores promedios de $35,60\pm28,86$, $1,80\pm0,71$, $3,42\pm0,94$ y $25,60\pm14,34\text{ mg.kg}^{-1}$, respectivamente (Tabla 3).

Tabla 3. Comportamiento de propiedades fisicoquímicas del suelo.

Cobertura	Da	Pt	pH	MO	S	P	Ca	Mg	K	Cu	Fe	Zn	Mn
Bh1	1,06±0,05	57,60±1,74	6,66±0,26	3,61±0,63	16,70±5,94	9,73±4,08	11,48±4,55	13,08±1,69	0,77±0,31	1,40±0,21	22,30±4,85	3,40±0,88	22,80±7,78
Bh2	1,08±0,03	56,74±0,87	6,69±0,38	3,36±0,59	36,38±33,92	8,60±4,49	14,38±0,79	12,00±1,77	0,65±0,22	2,20±0,48	22,60±6,08	3,30±1,11	39,90±24,93
Pm1	1,19±0,03	53,30±1,06	6,51±0,16	3,75±0,36	13,43±3,43	9,53±4,85	12,33±1,99	13,05±2,64	0,62±0,17	1,30±0,56	24,40±9,09	4,10±0,63	27,10±16,21
Pm2	1,13±0,05	55,43±2,09	6,51±0,15	3,68±0,32	13,85±4,34	18,25±19,74	12,33±2,68	11,55±1,06	0,99±0,50	2,00±0,60	53,40±33,98	3,30±1,26	21,80±4,39
Sd1	1,09±0,09	55,82±3,80	6,50±0,45	3,39±0,62	42,60±45,55	8,43±4,82	13,98±2,68	12,38±1,88	0,62±0,25	1,60±0,80	20,60±11,32	3,20±0,68	21,30±6,84
Sd2	1,06±0,04	58,65±1,34	6,45±0,04	3,44±0,49	23,95±26,92	8,15±2,46	13,98±1,99	11,20±1,41	0,54±0,46	2,30±0,88	70,30±40,42	3,20±0,91	20,70±7,66
media	1,10±0,07	56,25±2,60	6,55±0,28	3,54±0,51	24,48±26,99	10,45±9,17	13,08±2,77	12,21±1,85	0,69±0,36	1,80±0,71	35,60±28,86	3,42±0,94	25,60±14,34
cv	4,83	3,62	4,25	14,51	110,25	87,82	21,22	15,17	50,99	39,43	81,08	27,53	56,00
R ²	0,48	0,46	0,18	0,1	0,25	0,15	0,19	0,35	0,18	0,34	0,47	0,14	0,26

Da = densidad aparente del suelo (g.cm⁻³); Pt = porosidad total del suelo (%); pH = reacción del suelo; MO = contenido de materia orgánica (%).

S y P = contenido de azufre y fósforo disponible del suelo (mg.kg⁻¹); Ca, Mg y K = calcio, magnesio y potasio (cmol(+).kg⁻¹).

Cu, Fe, Zn y Mn = cobre, hierro, zinc y manganeso (mg.kg⁻¹); CV = coeficiente de variación (%) y R² = coeficiente de determinación.

El comportamiento de la WFPS mostró variaciones asociadas al periodo de evaluación (Figura 1), donde los menores valores se presentaron en las épocas asociadas a bajas precipitaciones (diciembre de 2014 a abril de 2015). A partir de mayo, con el inicio de la temporada de lluvias, los valores de WFPS aumentaron, con valores que fluctuaron entre 55,55 y 57,57%. En

julio (2015) se presentó una época de bajas precipitaciones, correspondiente a un periodo conocido en la región como Veranillo de San Juan, con lo cual los valores de WFPS disminuyeron, pero a partir del mes de agosto, con el reinicio de las precipitaciones, la WFPS mantuvo valores superiores al 60%, hasta final del periodo experimental (Figura 1).

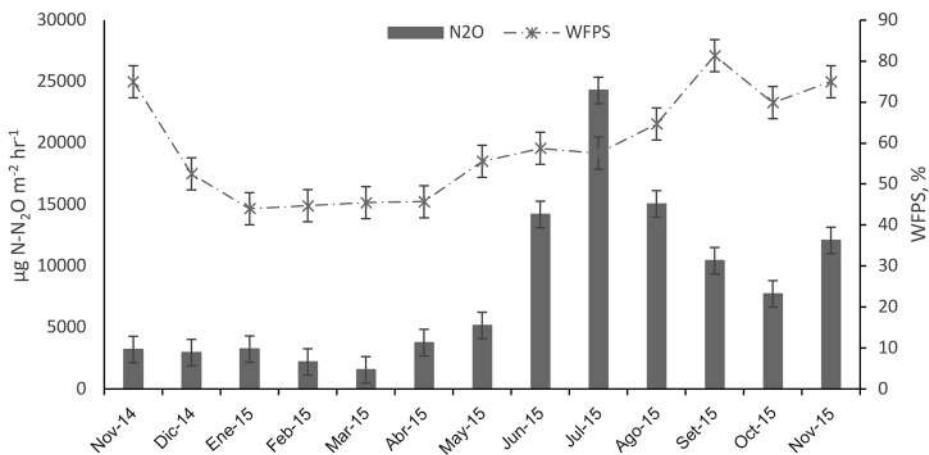


Figura 1. Comportamiento de los flujos de óxido nitroso (N_2O) durante el periodo de 12 meses de evaluaciones. C.I Turipaná, Cereté – Córdoba. 2015.

Flujos de Óxido nitroso (N_2O). Las dinámicas de los flujos de N_2O mostraron una fuerte relación ($p<0,0001$) en relación con las variaciones en las precipitaciones. Al inicio del periodo experimental, en periodos de bajas precipitaciones, entre noviembre de 2014 hasta mayo de 2015, los flujos de N_2O alcanzaron los menores valores promedios de emisión, con un promedio de 3154,2 $\mu\text{g N-N}_2\text{O m}^{-2} \text{h}^{-1}$ y un rango de variación entre 1554,4 a 5159,9 $\mu\text{g N-N}_2\text{O m}^{-2} \text{h}^{-1}$, siendo marzo (2015) el de menor emisión (Figura 1). Asimismo, se observó que, con el inicio de la temporada de lluvias, los flujos de N_2O aumentaron, registrándose los mayores valores entre junio a agosto 2015, siendo julio de 2015 donde se observó el pico máximo de emisiones, con valores que alcanzaron los 24284,3 $\mu\text{g N-N}_2\text{O m}^{-2} \text{h}^{-1}$.

En relación con los tratamientos evaluados se observó una interacción significativa

($p<0,05$), entre los flujos de N_2O y las dosis de nitrógeno y la cobertura utilizada. En el caso de la pastura *Brachiaria humidicola* cv. CIAT679, los flujos de N_2O aumentaron con el incremento en la dosis de fertilización N, de 2000 $\mu\text{g N-N}_2\text{O m}^{-2} \text{h}^{-1}$ con 0 $\text{kg.ha}^{-1} \text{año}^{-1}$ N a 8000 $\mu\text{g N-N}_2\text{O m}^{-2} \text{h}^{-1}$ con 300 $\text{kg.ha}^{-1} \text{año}^{-1}$ N (Figura 2). Un comportamiento similar se observó en la pastura *Panicum maximum* cv. Tanzania en donde el incremento en las emisiones de N_2O fueron de 2,0 a 2,7 veces superior, al aplicar las dosis superiores de nitrógeno al suelo (150 y 300 $\text{kg.ha}^{-1} \text{año}^{-1}$ N). En los suelos suelo sin cobertura de pasturas, los flujos de N_2O fueron superiores a los suelos con cobertura e igualmente se incrementaron con el aumento en las dosis de fertilización nitrogenada, de 8000 a 14000 $\mu\text{g N-N}_2\text{O m}^{-2} \text{h}^{-1}$ con las dosificaciones de 150 y 300 kg.ha^{-1} N.

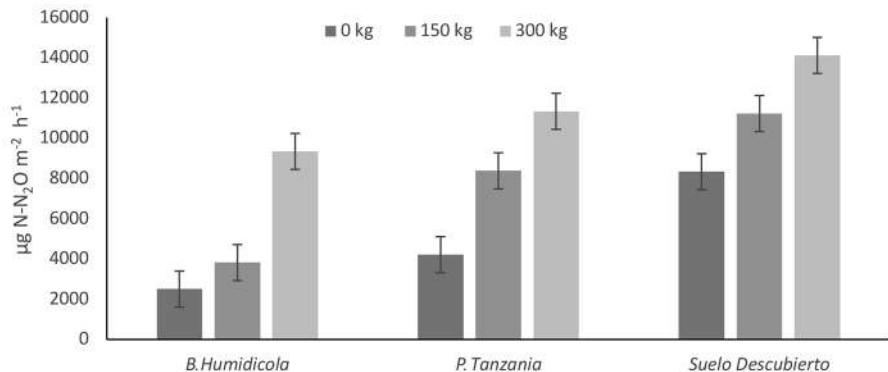


Figura 2. Comportamiento de los flujos de N_2O bajo diferentes dosis de fertilización nitrogenada en 3 tipos de cobertura. C.I. Turipaná, Cereté – Córdoba. 2015.

Los contrastes ortogonales permitieron comparar combinaciones entre tratamientos, que permitieron determinar que, bajo la misma dosis de fertilización nitrogenada ($150 \text{ kg.ha}^{-1}.\text{año}^{-1} \text{ N}$), los flujos de N_2O fueron inferiores en la pastura *Brachiaria humidicola* cv. CIAT679 que en *Panicum maximum* cv. Tanzania. Con valores promedios de $3819 \mu\text{g N-N}_2\text{O m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ y $8381,7 \mu\text{g N-N}_2\text{O m}^{-2} \text{ h}^{-1}$, respectivamente. La comparación de la cobertura con pasturas, en relación con el suelo descubierto, a una dosis de 150 kg.ha^{-1} , mostraron que bajo suelo descubierto las emisiones de N_2O se triplicaron, y alcanzaron un promedio de $11230,4 \mu\text{g N-N}_2\text{O m}^{-2} \text{ h}^{-1}$. Igual comportamiento se detectó, bajo la dosis de $300 \text{ kg.ha}^{-1}.\text{año}^{-1} \text{ N}$ (Figura 2).

Correlaciones. Los análisis de correlación corroboraron la relación significativa ($p<0,05$) entre los flujos de N_2O y el comportamiento de las variables ambientales y las propiedades

fisicoquímicas del suelo. Estos análisis mostraron una correlación positiva y significativa ($r=0,54$) entre los flujos de N_2O y la ocurrencia de las precipitaciones. De igual forma, se observó una correlación positiva y significativa de los flujos con la humedad relativa ($r=0,43$) e inversa con la temperatura ambiental ($r=-0,38$). Por otra parte, el espacio poroso ocupado por agua (WFPS) mostró correlación positiva ($r=0,53$), por los efectos directos de la humedad del suelo sobre los flujos de este gas. Igualmente, se encontraron correlaciones significativas ($p<0,05$) pero débiles entre algunas variables químicas de suelo, tales como el pH ($r=-0,15$), azufre en el suelo ($r=0,14$), potasio intercambiable ($r=-0,18$), hierro disponible ($r=0,11$) y contenido de sulfatos ($r=0,22$) (Tabla 4). Lo anterior indica que valores altos o bajos de estas variables pueden generar aumentos o disminuciones menores en las tasas de emisión de N_2O hacia la atmósfera.

Tabla 4. Análisis de correlación de Pearson de variables ambientales, edáficas y flujos de N₂O bajo el sistema de producción intensivo ganadero.

Variables	W	Pt	WFPS	Temp	Prec	HR	pH	S	Mg	K	Fe	SO4	CE	
N ₂ O	r	0,49	0,14	0,53	-0,38	0,54	0,43	-0,15	0,14	0,11	-0,18	0,11	0,22	0,1
	p	**	*	**	**	**	**	*	*	ns	*	*	**	ns

N₂O = Flujos de óxido nitroso ($\mu\text{g N-N}_2\text{O m}^{-2}\text{.h}^{-1}$); Prec = precipitación acumulada (mm.mes^{-1}), Temp = temperatura media ambiental ($^{\circ}\text{C}$); HR = humedad relativa media (%); W = humedad gravimétrica (g.g^{-1}); Pt = porosidad total del suelo (%), WFPS = porcentaje de poros llenos de agua (%); pH = concentración de iones H⁺ o reacción de la solución del suelo, S = contenido de azufre disponible en el suelo (mg.kg^{-1}), Mg = contenido de magnesio disponible en el suelo ($\text{cmol}(+)\text{.kg}^{-1}$); K = contenido de potasio disponible en el suelo ($\text{cmol}(+)\text{.kg}^{-1}$); Fe = hierro disponible en el suelo (mg.kg^{-1}); SO₄ = Sulfatos (meq.L^{-1}); CE = conductividad eléctrica (dS.m^{-1}); r = coeficientes de correlación de Pearson ($\alpha=0,05$); *p<0,01 significativo; ** = p<0,0001 altamente significativo y ns = p>0,05 no significativo.

El análisis de componentes principales (Tabla 5) mostró que 4 autovectores obtuvieron valores superiores a uno (>1), capaces de explicar el 80% las emisiones de N₂O generadas dentro de las coberturas. En este caso, el componente uno (CP 1) fue capaz de explicar el 32% de la varianza, componente que estuvo dominado por las variables espacio poroso lleno de agua (0,95), contenido de humedad del suelo (0,86) y la precipitación (0,82). El componente 2 (CP 2), fue capaz de explicar el 25,18% de la

varianza, lo que resalta los vectores relacionados con el contenido de sulfatos (0,96), el contenido de magnesio disponible (0,94) y el contenido de azufre del suelo (0,90). El componente 3 (CP 3) fue capaz de explicar el 12,79%, y estuvo dominado por las variables climáticas temperatura ambiental (0,89) y humedad relativa (0,81). El componente 4 (CP 4), fue capaz de explicar el 10,73% de los flujos de N₂O, y mostró dominancia por la variable física de suelo porosidad total (-0,87).

Tabla 5. Análisis de componentes principales de variables que mejor explican el comportamiento de los flujos de N₂O en el suelo.

	Componentes principales				Comunalidades
	CP 1	CP 2	CP 3	CP 4	
Autovalor	6,5	4,5	2,1	1,7	
Varianza (%)	32,08	25,18	12,79	10,73	
Acumulada (%)	32,08	57,27	70,05	80,78	
Indicador ^β		Vectores propios ⁺			
N ₂ O	0,66	0,13	-0,37	0,06	0,60
Prec	0,82	0,03	-0,20	0,06	0,72
Temp	-0,07	0,04	0,89	-0,12	0,82
HR	0,42	-0,04	-0,81	-0,12	0,85
W	0,86	0,07	-0,07	-0,39	0,89
Pt	0,09	-0,25	0,15	-0,87	0,85
WFPS	0,95	-0,04	-0,01	-0,02	0,91
pH	-0,17	0,03	-0,18	0,69	0,53
S	0,01	0,90	-0,04	-0,21	0,85
Mg	0,05	0,94	0,07	0,08	0,90
SO ₄	0,06	0,96	0,02	-0,11	0,94

β Indicadores fueron descritos en la Tabla 2.

+ Valores resaltados en negrita hacen referencia a variables que mejor explican el comportamiento del flujo de N₂O en el suelo.

DISCUSIÓN

La principal variable que en mayor medida afectó los flujos de N₂O al medio ambiente durante el periodo experimental estuvo relacionada con las condiciones ambientales, especialmente la precipitación y en el suelo por el espacio poroso ocupado por el agua. Lo anterior debido a los efectos del agua y la disponibilidad de oxígeno en el suelo sobre los procesos de nitrificación y denitrificación que ocurren permanentemente y de forma continua en el suelo. En este experimento, los picos más altos de emisiones de N₂O hacia la atmósfera ocurrieron durante los períodos de mayor precipitación, y acumulación de agua en el suelo. Estos resultados coinciden con reportes en la literatura en los que se relacionan

el comportamiento de la temporada de lluvias con el contenido de humedad en el suelo y los flujos de N₂O (Ussiri y Lal 2012, De Carvalho *et al.* 2017, Montenegro 2020). En este caso, las fluctuaciones del agua en el suelo estuvieron representadas por la WFPS, en donde los monitoreos en todos los casos mostraron valores inferiores al 60%, que indicaron suficientes condiciones de aireación en el suelo. Sin embargo, la dinámica de los procesos de nitrificación y desnitrificación ocurre permanentemente en el suelo, que provocan la formación o liberación de N₂O hacia la atmósfera (Rivera *et al.* 2018, Montenegro 2020). Las mayores liberaciones de N₂O en este experimento se generaron de julio a noviembre (2015), en los cuales se registraron

los mayores valores de precipitación, asociados a mayor tasa de acumulación de humedad edáfica. Los suelos del valle medio del Sinú prestan drenaje imperfecto que ocasiona que, en períodos de precipitaciones abundantes, se encharquen y demoren en la evacuación de los excesos de agua.

En relación con las coberturas, se resalta el comportamiento de la pastura *Brachiaria humidicola* cv. CIAT679 en la cual se registraron menores valores de emisiones de N_2O , aun a altas dosis de fertilización nitrogenada (150 y 300 $\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$). Estos resultados resaltan la importancia de las coberturas vegetales en la reducción de las emisiones de N_2O hacia la atmósfera, lo cual ha sido corroborado por otras personas autoras, en sistemas de producción ganadera y de cultivos (Singh *et al.* 2020). La capacidad de *Brachiaria humidicola* cv. CIAT679 para mostrar menores emisiones de N_2O , probablemente se relacionan con la liberación de metabolitos secundarios a la rizosfera (braquialactonas), que afectan la actividad microbial y los procesos de nitrificación y desnitrificación en el suelo (Pastrana *et al.* 2011, Byrnes *et al.* 2017, Simon *et al.* 2020, Nakamura *et al.* 2020).

La aplicación de fertilizantes nitrogenados amplia la disponibilidad de N en el suelo, lo que ocasionó, invariablemente mayores flujos de N_2O hacia la atmósfera (Dobbie *et al.* 1999, De Carvalho *et al.* 2017, Bastidas *et al.* (2020). En este caso, las coberturas vegetales reducen los impactos ambientales negativos que estas aplicaciones generan. Para nuestro caso la pastura *Brachiaria humidicola* cv. CIAT679, mostró una reducción del 33% en las emisiones (9347,1 $\mu\text{g N-N}_2\text{O m}^{-2} \text{h}^{-1}$), comparado con las emisiones en suelo descubierto (14121 $\mu\text{g N-N}_2\text{O m}^{-2} \text{h}^{-1}$), bajo dosis de aplicación superiores a 150 $\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{año}^{-1}$ N.

CONCLUSIONES

La tendencia creciente de fertilización de las pasturas con fuentes nitrogenadas para aumentar la disponibilidad de forraje aumenta el riesgo de generar altas cantidades de N_2O a la

atmósfera. Sin embargo, el uso de coberturas con gramíneas puede atenuar en parte estos efectos, en donde diferentes especies o cultívares pueden ejercer una mejor función. Según estos resultados, la pastura *Brachiaria humidicola* cv CIAT679 establecida en los sistemas de producción ganaderos en el Valle Medio del Sinú, podría contribuir en mayor medida en reducir las emisiones de óxido nitroso en más del 40%, frente a otras pasturas de corriente uso en la región.

AGRADECIMIENTOS

Las personas autoras expresan su gratitud con la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA) y el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR) por financiar el proyecto titulado “Flujos De Gases De Efecto Invernadero En Sistemas Intensivos De Producción De Carne En Suelos Del Valle Medio Del Sinú” generado como opción de grado de maestría, derivado del proyecto “Producción intensiva de carne en pasturas con diferente capacidad para inhibir la nitrificación y reducir las emisiones de gases de efecto invernadero” bajo de la cual se obtuvo este documento.

LITERATURA CITADA

- Bastidas, M; Villegas, D; Ruden, A; Mazabel, J; Enciso, K; Gutierrez, JF; Arango, J. 2020. Determinación de la eficiencia en el uso del nitrógeno (UEN) por principales pasturas forrajeras de trópico bajo en respuesta a diferentes fertilizantes nitrogenados - Informe final de resultados. Palmira, Colombia, Alianza Bioversity International - CIAT. 79 p.
- Bernabé, Y; Maineult, A. 2015. Physics of porous media: fluid Flux through porous media. In Schubert, G (ed.) Treatise on Geophysics. 2 ed. Vol 11. Resources in near-surface earth. Elsevier, Amsterdam, NLD. p.19-41. DOI: 10.1016/b978-0-444-53802-4.00188-3.
- Bodelier, PLE; Laanbroek, HJ. 2004. Nitrogen as a regulatory factor of methane oxidation in soils and sediments. FEMS Microbiol. Ecol. 47:265-277.
- Burt, R. 2014. Soil survey field and laboratory methods manual. Soil Survey Investigations Report N°. 51, Version 2. WA, USA, US Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service. s.p.

- Butterbach-Bahl, K; Baggs, EM; Dannenmann, M; Kiese, R; Zechmeister-Boltenstern, S. 2013. Nitrous oxide emissions from soils: how well do we understand the processes and their controls? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 368(1621):20130122. DOI:10.1098/rstb.2013.0122.
- Bray, RH; Kurtz, LT. 1945. Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soils. *Soil Science* 59(1):39-46. DOI: 10.1097/00010694-194501000-00006.
- Byrnes, RC; Núñez, L; Arenas, J; Rao, I; Trujillo, C; Alvarez, C; Arango, J; Rasche, F; Chirinda, N. 2017. Biological nitrification inhibition by *Brachiaria* grasses mitigates soil nitrous oxide emissions from bovine urine patches. *Soil Biol. Biochem.* 107:156-163. DOI: 10.1016/j.soilbio.2016.12.029.
- Cameron, KC; Di, HJ; Moir, JL. 2013. Nitrogen losses from the soil/plant system: a review. *Annals of Applied Biology* 162(2):145-173. DOI: 10.1111/aab.12014.
- Capa, MED. 2015. Efecto de la fertilización orgánica y mineral en las propiedades del suelo, la emisión de los principales gases de efecto invernadero y en las diferentes fases fenológicas del cultivo de café (*Coffea arabica* L.). Tesis Ph.D. Madrid, España, Universidad de Madrid. 190 p.
- CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza). 2015. Medición de óxido nitroso en pasturas de Costa Rica (en línea). Costa Rica. Consultado 12 set. 2021. Disponible en <https://www.catie.ac.cr/catie-noticias/943-miden-oxido-nitroso-en-pasturas-de-costa-rica.html>
- Chapman, HD. 2016. Cation-exchange capacity. Methods of Soil Analysis. American Society of Agronomy. Wisconsin, USA, American Society of Agronomy. p. 891-901. DOI: 10.2134/agronmonogr9.2.c6.
- Clough, TJ; Cardenas, LM; Friedl, J; Wolf, B. 2020. Nitrous oxide emissions from ruminant urine: science and mitigation for intensively managed perennial pastures. *Current Opinion in Environmental Sustainability* 47:21-27. DOI: 10.1016/j.cosust.2020.07.001.
- Contreras-Santos, J; Martínez-Atencia, J; Raghavan, B; López-Rebolledo, L; Garrido-Pineda, J. 2021. Silvopastoral systems: Mitigation of greenhouse gases in the Tropical Dry Forest – Colombia. *Agronomía Mesoamericana* 32(3):901-919. DOI: 10.15517/am.v32i3.43313.
- Dalal, RC; Wang, WJ; Robertson, GP; Parton, WJ. 2003. Nitrous oxide emission from Australian agricultural lands and mitigation options: a review. *Aust. J. Soil Res.* 41:165-195.
- De Carvalho, AM; de Oliveira, WRD; Ramos, MLG; Coser, TR; de Oliveira, AD; Pulrolnik, K; Souza, KW; Vileta, L; Marchão, RL. 2017. Soil N₂O fluxes in integrated production systems, continuous pasture and Cerrado. *Nutr. Cycl. Agroecosystems* 108(1):69-83. DOI: 10.1007/s10705-017-9823-4.
- Dobbie, KE; McTaggart, IP; Smith, KA. 1999. Nitrous oxide emissions from intensive agricultural systems: Variations between crops and seasons, key driving variables, and mean emission factors. *J. Geophys. Res. Atmos.* 104(D21):26891-26899. DOI: 10.1029/1999jd900378.
- Erickson, H; Keller, M; Davidson, EA. 2001. Nitrogen oxide fluxes and nitrogen cycling during post-agricultural succession and forest fertilization in the humid tropics. *Ecosystems* 4:67-84.
- Espinosa-Carvajal, M; Contreras-Santos, J; Cadena, J; Martínez-Atencia, J; Jaramillo-Barrios, C; Hurtado, M. 2020. Flujos de metano en suelos con coberturas de pastos en el norte de Colombia. *Agronomía Mesoamericana* 31(2):291-309. DOI: 10.15517/am.v31i2.38387.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) y GTIS (Grupo Técnico Intergubernamental de Suelos). 2015. Estado Mundial del Re-curso Suelo (EMRS) - Resumen Técnico. Grupo Técnico Intergubernamental del Suelo y Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura y Grupo Técnico. s.p.
- Gao, B; Ju, X; Su, F; Meng, Q; Oenema, O; Christie, P; Chen, X; Zhang, F. 2014. Nitrous oxide and methane emissions from optimized and alternative cereal cropping systems on the North China Plain: a two-year field study. *Sci. Total Environ.* 472:112-124. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2013.11.003.
- González-Estrada, A; Camacho-Amador, M. 2017. Emisión de gases de efecto invernadero de la fertilización nitrogenada en México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 8(8):1733-1745. DOI: 10.29312/remexca.v8i8.698.
- Gulledge, J; Schimel, JP. 2000. Controls on soil carbon dioxide and methane fluxes in a variety of taiga forest stands in interior Alaska. *Ecosystems* 3:269-282.
- Hendershot, W; Lalande, H; Duquette, M. 2007. Ion exchange and exchangeable cations 2 ed. In Carter, MR; Gregorich, EG (eds.). *Soil Sampling and Methods of Analysis*. Canada, Canadian Society of Soil Science. p. 197-207.
- Herrero, M; Henderson, B; Havlik, P; Thornton, PK; Conant, RT; Smith, P; Wirsén, S; Hristov, AN; Gerber, P; Gill, M; Butterbach-Bahl, K; Valin, H; Garnett, T; Stehfest, E. 2016. Greenhouse gas mitigation potentials in the livestock sector. *Nature Climate Change* 6(5):452-461. DOI: 10.1038/nclimate2925.
- Holdridge, LR. 2000. Ecología basada en zonas de vida. 5 ed. San José, Costa Rica, IICA. 225 p.

- IGAC (Instituto Geográfico Agustín Codazzi). 2006. Métodos analíticos del laboratorio de suelos. 6 ed. Bogotá, Colombia, Imprenta Nacional de Colombia. sp.
- Lam, SK; Suter, H; Bai, M; Walker, C; Davies, R; Mosier, AR; Chen, D. 2018. Using urease and nitrification inhibitors to decrease ammonia and nitrous oxide emissions and improve productivity in a subtropical pasture. *Science of The Total Environment*, 644:1531-1535. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.07.092.
- LeBauer, DS; Treseder, KK. 2008. Nitrogen limitation of net primary productivity in terrestrial ecosystems is globally distributed. *Ecology* 89:371-379.
- Liang, LL; Campbell, DI; Wall, AM; Schipper, LA. 2018. Nitrous oxide fluxes determined by continuous eddy covariance measurements from intensively grazed pastures: Temporal patterns and environmental controls. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 268:171-180. DOI: 10.1016/j.agee.2018.09.010.
- Montenegro, J. 2020. Efecto de diferentes fuentes de nitrógeno en la emisión de óxido nitroso en plantaciones de café en Costa Rica. *R. C. A.* 54(2):111-130. DOI: 10.15359/rca.54-2-6.
- Nakamura, S; Saliou, PS; Takahashi, M; Ando, Y; Subbarao, GV. 2020. La contribución de la rotación de raíces en la inhibición de la nitrificación biológica y su impacto en las arqueas oxidantes de amoníaco en cultivos de Brachiaria. *Agronomía* 10(7):1003. DOI: 10.3390/agronomy10071003.
- Neff, JC; Bowman, WD; Holland, EA; Fisk, MC; Schmidt, SK. 1994. Fluxes of nitrous-oxide and methane from nitrogenamended soils in a Colorado alpine ecosystem. *Biogeochemistry* 27:23-33.
- Nelson, D; Sommers, L. 1983. Total carbon, organic carbon and organic matter. 2 ed. *In* Page, A; Miller, R; Kenney, D (eds.). *Methods of soil analysis. Part 2 Chemical and microbiological properties*. Wisconsin, USA, American Society of Agronomy and Soil Science Society of America. p. 403-430.
- Pastrana, I; Reza, S; Espinosa, M; Suárez, E; Díaz, E. 2011. Efecto de la fertilización nitrogenada en la dinámica del óxido nitroso y metano en Brachiaria humidicola (Rendle) Schweickerdt. *Ciencia & Tecnología* Agropecuaria 12(2):134-142. DOI: 10.21930/rcta.vol12_num2_art:223.
- Pulido, A; Turriago, J; Jiménez, R; Torres, C; Rojas, A; Chaparro, N; López, A. 2016. *Inventario nacional y departamental de gases efecto invernadero-Colombia. Tercera Comunicación Nacional de Cambio Climático*. IDEAM, PNUD, MADS, DNP, CANCILLERIA, y FMAM, Bogotá, Colombia. s.p.
- Ravishankara, AR; Daniel, JS; Portmann, RW. 2009. Nitrous Oxide (N_2O): The Dominant Ozone-Depleting Substance Emitted in the 21 st Century. *Science* 326(5949):123-125. DOI: 10.1126/science.1176985.
- Rivera, JE; Chará, J; Barahona, R. 2018. CH₄, CO₂ and N₂O emissions from grasslands and bovine excreta in two intensive tropical dairy production systems. *Agrofor. Syst.* 93(3):915-928. DOI: 10.1007/s10457-018-0187-9.
- Rondón, M. 2000. Land use and balances of greenhouse gases in Colombian Tropical Savannas. Ph.D. Thesis. NY, USA, Cornell University. 211 p.
- Simon, PL; Dieckow, J; Zanatta, JA; Ramalho, B; Ribeiro, RH; van der Weerden, T; de Klein, CAM. 2020. Does Brachiaria humidicola and dicyandiamide reduce nitrous oxide and ammonia emissions from cattle urine patches in the subtropics?. *Sci. Total Environ.* 720:137-692. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.137692.
- Singh, N; Abagandura, GO; Kumar, S. 2020. Short-term grazing of cover crops and maize residue impacts on soil greenhouse gas fluxes in two Mollisols. *Journal of Environmental Quality* 49(3):628-639. DOI: 10.1002/jeq2.20063.
- Soil Survey Staff. 2014. *Keys to soil taxonomy* 12 ed. USDA-Natural Resources Conservation Service. USA, United States Department of Agriculture. 399 p.
- Torres, CF. 2020. *Fertilización nitrogenada, línea base y proyecciones de gases de efecto invernadero en Colombia*. Colombia, CGIAR Research Program on Climate Change, Agriculture and Food Security (CCAFS). s.p.
- Ussiri, D; Lal, R. 2012. Nitrous Oxide Sources and Mitigation Strategies. *In* *Soil Emission of Nitrous Oxide and its Mitigation*. Springer, Dordrecht. DOI: 10.1007/978-94-007-5364-8_8.



Todos los derechos reservados. Universidad de Costa Rica. Este artículo se encuentra licenciado con Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Costa Rica. Para mayor información escribir a rac.cia@ucr.ac.cr

CARACTERIZACIÓN CULTURAL-MORFOMÉTRICA COMO HERRAMIENTA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *Fusarium* spp., ASOCIADO A *Nicotiana tabacum* L.

Oandis Sosa-Sánchez¹, Mirella Romero-Bastidas², Juan José Silva-Pupo³, Ramiro Remigio Gaibor-Fernández⁴, Sergio Florentino Rodríguez-Rodríguez⁵, Wilson Geobel Ceiro-Catasú⁶/*

Palabras clave: Especies fúngicas; pudrición basal del tallo; tabaco; taxonomía.

Keywords: Fungal species; basal stem rot; tobacco; taxonomy.

Recibido: 14/12/2020

Aceptado: 25/03/2021

RESUMEN

Introducción. *Nicotiana tabacum* L., es un cultivo de importancia económica como producto exportable en Cuba y sus plantaciones pueden ser afectadas significativamente por el fitopatógeno *Fusarium* spp. **Objetivo.** El objetivo fue caracterizar cultural y morfométricamente las especies de *Fusarium* asociadas a *N. tabacum*. **Materiales y métodos.** Se colectaron muestras de plantas con afectaciones vasculares, marchitamiento, clorosis y necrosis en tallos y hojas en áreas especializadas en la producción tabacalera en la provincia cubana de Granma. A partir de los tejidos vegetales analizados se obtuvieron 9 aislados en medio Papa Dextrosa Agar (PDA), que se purificaron con cultivos monosporícos. Se utilizaron los medios PDA, Carnation Leafpiece Agar (CLA), Spezieller Nährstofffarmer Agar (SNA) y Agar Nutriente (AN) para la

ABSTRACT

Cultural-morphometric characterization as a tool for the identification of *Fusarium* spp., associated with *Nicotiana tabacum* L.

Introduction. *Nicotiana tabacum* L., is a crop of economic importance as an exportable product in Cuba and its plantations can be significantly affected by the phytopathogen *Fusarium* spp. **Objective.** The objective was to characterize culturally and morphometrically the *Fusarium* species associated with *N. tabacum*. **Materials and methods.** Samples of plants with vascular affectations, wilting, chlorosis and necrosis in stems and leaves were collected in areas specialized in tobacco production in the Cuban province of Granma. From the analyzed plant tissues, 9 isolates were obtained in Potato Dextrose Agar (PDA) medium, which were purified by monosporic cultures. PDA,

* Autor para correspondencia. Correo electrónico: wceiroc@udg.co.cu

1 Universidad de Granma, Departamento Agronomía, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Bayamo, Granma, Cuba.
 0000-0002-8231-3822.

2 Universidad Autónoma de Baja California Sur, Departamento Académico de Agronomía, La Paz, B.C.S., México.
 0000-0002-1579-0194.

3 Universidad de Granma, Departamento Agronomía, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Bayamo, Granma, Cuba.
 0000-0003-1049-5740.

4 Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Agronomía, Los Ríos, Ecuador.

 0000-0002-0981-2000.

5 Universidad de Granma, Departamento Agronomía, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Bayamo, Granma, Cuba.
 0000-0003-2923-5092.

6 Universidad de Granma, Departamento Agronomía, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Bayamo, Granma, Cuba.
 0000-0003-2065-2279.

caracterización cultural-morfométrica sobre la base de caracteres cualitativos y cuantitativos. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado y el procesamiento estadístico se realizó mediante un ANOVA factorial y la prueba de Tukey, procesado con InfoStat 2008. **Resultados.** Los resultados confirmaron la existencia de 9 aislados de *Fusarium*, de ellos, 5 de *F. oxysporum* y 4 de *F. phyllophylum*. La caracterización combinada cultural-morfométrica demostró una mayor variabilidad de la pigmentación en medio PDA en ambas especies de *Fusarium* y evidenció diferenciación inter e intraespecífica en la formación de estructuras microscópicas, constatándose macroconidios con una talla de 8,17-33,35 x 1,45-6,30 µm en *F. oxysporum* y de 6,68-20,10 x 1,42-4,67 µm en *F. phyllophylum*. **Conclusiones.** Se caracterizan eficazmente por el método combinado cultural-morfométrico 9 aislados de *Fusarium* spp., (5 de *F. oxysporum* y 4 de *F. phyllophylum*) y se pone de manifiesto la selectividad de estas 2 especies por *N. tabacum*.

Carnation Leafpiece Agar (CLA), Spezieller Nährstofffarmer Agar (SNA) and Nutrient Agar (AN) media were used for cultural-morphometric characterization on the basis of qualitative and quantitative traits. A completely randomized design was used and statistical processing was performed using factorial ANOVA and Tukey's test, processed with InfoStat 2008. **Results.** The results confirmed the existence of 9 isolates of *Fusarium*, of them, 5 of *F. oxysporum* and 4 of *F. phyllophylum*. The combined cultural-morphometric characterization demonstrated greater variability of pigmentation in PDA medium in both *Fusarium* species and evidenced inter and intraspecific differentiation in the formation of microscopic structures, verifying macroconidia with a size of 8.17-33.35 x 1.45-6.30 µm in *F. oxysporum* and 6.68-20.10 x 1.42-4.67 µm in *F. phyllophylum*. **Conclusions.** Nine *Fusarium* spp. Isolates (5 from *F. oxysporum* and 4 from *F. phyllophylum*) are efficiently characterized by the combined cultural-morphometric method and the selectivity of these 2 species for *N. tabacum* is demonstrated.

INTRODUCCIÓN

El tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) es una de las plantas comerciales no comestibles que ocupa mayor área de siembra en la agricultura mundial y es uno de los pocos cultivos agroindustriales que se comercializa completamente en forma de hojas (Calero-Hurtado *et al.* 2019). En Cuba la producción de *N. tabacum* se realiza principalmente al sol y empalado, del cual se obtiene el puro cubano que posee una excelente calidad y un alto costo en el mercado internacional (Toledo *et al.* 2016).

En Cuba se plantan anualmente aproximadamente 15 868 ha, con un rendimiento promedio de 3,89 t.ha⁻¹, mientras que, en la provincia Granma solamente se obtienen 1,0 t.ha⁻¹. Este

bajo rendimiento puede ser atribuido a las afectaciones del fitopatógeno *Fusarium* spp. (Barceló y Mustelier 2019). Esta especie fungica se conoce mundialmente por causar la enfermedad denominada marchitez vascular y es capaz de ocasionar la pudrición basal del tallo en tabaco. Tanto en semilleros como en campo abierto, causa daños en el sistema radical, que afecta directamente los procesos de absorción de agua y nutrientes e influye negativamente sobre el rendimiento y calidad del cultivo (Retana *et al.* 2018).

La identificación de *Fusarium* spp., es compleja y requiere de mucho tiempo, recursos humanos y materiales. La caracterización cultural posibilita el desarrollo de microorganismos en un medio de cultivo in vitro y con ello, los aspectos cualitativos relacionados con la forma,

tamaño, textura, coloración, esporulación, entre otros, mientras que la morfométrica permite dilucidar las estructuras de interés taxonómico para determinar elementos relacionados con su talla. Por tanto, la combinación de estas formas de caracterización propone una efectiva identificación de especies fúngicas con claves ilustradas, sin recurrir a las técnicas moleculares que requieren mayor cantidad de recursos materiales y financieros, inaccesibles para muchos países pobres y en vías de desarrollo (Leslie y Summerville 2008, Castro López *et al.* 2018).

Conocer las principales características de las especies de *Fusarium* que afectan a *N. tabacum* en agroecosistemas tabacaleros de la provincia Granma, resultará de gran interés científico para los programas de mejora de esta planta y para el establecimiento de alternativas de manejo del fitopatógeno en etapa de semillero y en campo. Según lo anterior, el objetivo de esta investigación fue caracterizar

cultural-morfométricamente las especies de *Fusarium* asociadas a *N. tabacum* cultivado en la provincia Granma, Cuba.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo. Se muestrearon áreas especializadas en la producción de *N. tabacum* a campo abierto en la provincia Granma (Tabla 1). Las plantaciones tenían edades entre 20-40 días después del trasplante. Los campos se muestrearon en forma diagonal, se colectaron plantas enteras con daños evidentes de pudrición basal del tallo, con síntomas de clorosis y marchitez del follaje (González *et al.* 2005). Las muestras obtenidas se introdujeron en bolsas de nylon y se trasladaron inmediatamente al Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal (CEBVEG), Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Granma, Cuba, para su procesamiento y caracterización.

Tabla 1. Lugar de procedencia de las muestras. Cuba.

Municipio	Localidad	Coordenadas	
		Norte	Oeste
Buey Arriba	Bueycito	20°14'20.5	76°46'28.8
	Corojito	20°11'05.2	76°43'21.7
Guisa	Monjará	20°17'51.9	76°36'08.7
Bayamo	El Dorado	20°15'52.3	76°44'43.8
Jiguaní	Santa Rita	20°20'11.9	76°29'24.1
Yara	Los Cayos	20°18'20.2	76°50'00.6

Procesamiento en laboratorio. Cada muestra se cortó en fragmentos de 1 cm y se desinfestó con hipoclorito de sodio (NaClO) al 1,0% durante 3 minutos; luego se lavaron con detergente comercial y finalmente se enjuagaron 3 veces con agua destilada esterilizada.

Seguidamente se establecieron cámaras húmedas en placas Petri ($\varnothing = 90$ mm) con papel de filtro esterilizado y humedecido. Se incubaron a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ y se observaron diariamente hasta la aparición de estructuras fúngicas durante 168 h. Luego se verificó la presencia de *Fusarium* spp.,

al microscopio óptico (Novel, modelo N200M, China) y con ayuda de un asa de siembra se recogieron fragmentos de micelio que fueron sembrados en placas Petri ($\varnothing = 90$ mm) en medio PDA: 39 g.L⁻¹ BioCen, esterilizado a 121°C durante 15 min y pH = 6) más cloranfenicol (0,01 g.L⁻¹), incubándose a 28±2°C en oscuridad hasta lograr el crecimiento de las colonias.

Las colonias crecidas en las placas se cubrieron con 10 mL de agua destilada estéril y se homogenizaron en un agitador Vortex por 30 s. Con un asa bacteriológica desinfectada, se tomó una asada de la suspensión y se depositó en el centro de las placas ($\varnothing = 90$ mm) que contenía 5 mL de medio de cultivo Agar agua (2%) para dispersarla con una varilla L de vidrio. Todas las placas se sellaron con parafilm y se incubaron a 28±2°C y oscuridad durante 24 h. Luego, bajo microscopio óptico (20x) se detectaron y señalaron conidios solitarios germinados. Seguidamente con una aguja de siembra flameada se transfirió el fragmento de agar que contenía el conidio germinado a una placa Petri con medio de cultivo PDA más cloranfenicol. Las placas se sellaron con parafilm e incubaron a 28±2°C durante 7 días. Una vez que se lograron los cultivos puros monospóricos se conservaron a 4°C. Posteriormente, se comprobaron los postulados de Koch (Duarte *et al.* 2016).

Caracterización cultural-morfométrica de aislados de *Fusarium* spp. Se realizó sobre la base de caracteres cualitativos y cuantitativos, expresados por los aislados sobre los medios de cultivo PDA, Carnation Leafpiece Agar (CLA) se elaboró al verter en cada placa 15 ml de Agar agua estéril; seguidamente se depositaron 7 fragmentos de hojas de clavel (*Dianthus caryophyllus* L) de 3-5 mm² previamente esterilizadas y pH ajustado a 6), Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA: 1g de KH₂PO₄, 1g de KNO₃, 0,5 de MgSO₄.7H₂O, 0,5 de KCl, 0,2 de glucosa, 0,2 de sacarosa, 20g de Agar, esterilizado a 121°C durante 15 min y pH ajustado a 6) y agar nutritivo (AN: 28 g.L⁻¹ BioCen, esterilizado a 121°C durante 15 min y pH ajustado a 6). Se emplearon placas Petri ($\varnothing = 90$ mm) que contenían 20 mL

de cada medio de cultivo independientemente. Las mismas se inocularon, central e individualmente, con un disco de micelio ($\varnothing = 5$ mm) de cada aislado, proveniente de la periferia de colonias crecidas sobre PDA durante 7 días. Las placas, 4 por aislado (réplicas), se sellaron con parafilm e incubaron (28±2°C y oscuridad). Las evaluaciones se realizaron cada 24 h hasta las 168 h. La coloración de la colonia en el anverso y reverso se determinó por observación visual y se documentó mediante fotografías con una cámara digital. También se describió la textura superficial, forma de los bordes, presencia de anillos en el anverso, formación de sectores y concentración de esporas. Se midió el diámetro de la colonia con una métrica graduada. A partir del diámetro de la colonia se calculó la velocidad media de crecimiento al séptimo día de incubación, mediante el empleo de la siguiente fórmula:

$$V_{\text{crec}} = DC/T$$

Donde

V_{crec} = velocidad de crecimiento del aislado (mm.h⁻¹)

DC = diámetro de las colonias (mm)

T = tiempo transcurrido (h)

El conteo de las esporas se realizó a los 7 días del crecimiento de las colonias de cada aislado y en cada medio. A las placas con los aislados crecidos se le adicionó 10 mL de agua destilada estéril y se homogeneizaron con una varilla L de vidrio. La suspensión de esporas se colectó en un tubo de ensayo con una capacidad de 20 mL. A partir de estas, se prepararon diluciones hasta 10⁻². Se usó un tubo capilar para extraer pequeñas porciones de la dilución y se depositó una gota en una cámara de Neubauer para determinar la concentración de los macroconidios con ayuda de un microscopio Novel a 40x.

Aspectos taxonómicos evaluados. Se preparó un microcultivo en porta objeto cavado con medio CLA, donde se depositó un fragmento

de 3-5 mm² de hoja de clavel esterilizado y sobre este se añadió una gota de medio agar agua (AA: 20 g.L⁻¹ BioCen, esterilizado a 121°C durante 15 min y pH ajustado a 6). Una vez solidificado el medio se inoculó cada aislado con ayuda de una aguja de siembra. Seguidamente se estableció el microcultivo en una cámara húmeda. Posteriormente, a las 24 h se visualizaron al microscopio óptico (40x) los macroconidios, células conidiógenas y microconidios (presencia y disposición). Se hicieron preparaciones microscópicas permanentes para observar la forma, el tamaño de los macroconidios y los septos, y se determinó la presencia y disposición de las clamidosporas. Se observó la pigmentación en todos los medios. En PDA se determinó la forma y la velocidad de crecimiento de las colonias, la formación de esporodoquios y el número de septos en los macroconidios; mientras que, en SNA se observó la presencia de clamidosporas y la forma de los micro y macroconidios. La caracterización hasta nivel de especie se efectuó con la clave taxonómica ilustrada (Leslie y Summerell 2008).

Diseño y procesamiento estadístico. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado

con arreglo bifactorial: Factor A (4 medios de cultivos) y factor B (9 aislados de *Fusarium* spp.) para un total de 36 interacciones o tratamientos y 4 réplicas. Se usó un ANOVA bifactorial y la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey ($p \leq 0,05$). Previamente al ANOVA los valores de concentración de macroconidios fueron transformados por LOG (x+1), procesado con el programa estadístico InfoStat 2008.

RESULTADOS

Caracterización cultural de los aislados de *Fusarium* spp. Al analizar la pigmentación de los aislados de *Fusarium* spp., en el anverso de las placas en medio PDA se observó que variaron entre blanco y blanco cremoso, excepto el aislado F que presentó tonalidad violeta. En el reverso la coloración observada fue color crema y blanco. Todos los aislados presentaron colonias con bordes redondeados y regulares, con una textura afelpada y algodonosa. La formación de anillos se evidenció en los aislados C y G, mientras, que en el aislado H además de estos caracteres se notaron sectores (Figura 1).

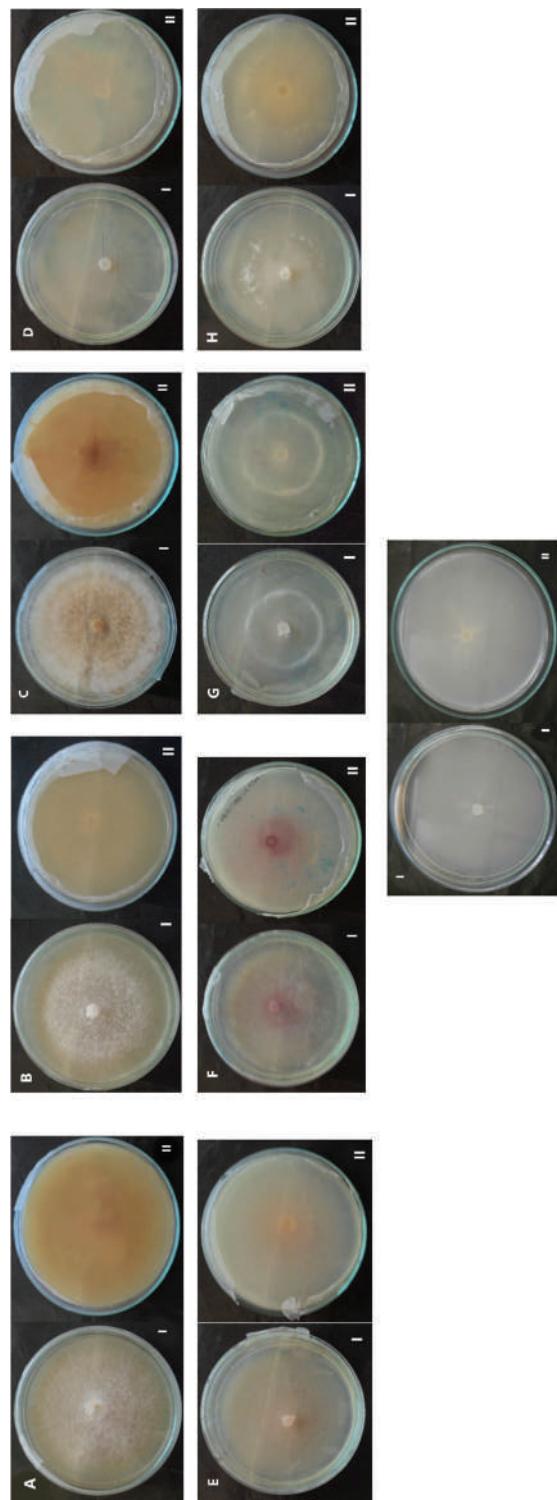


Figura 1. Características culturales de las colonias de 9 aislados de *Fusarium* spp. procedentes de *N. tabacum* en medio PDA (I: anverso, II: reverso).

Por otra parte, en el medio SNA los aislados desarrollaron tonalidades de color blanco, excepto los aislados C y F que presentaron color blanco-amarillento. Los bordes fueron redondeados y regulares con una textura algodonosa. La formación de anillos se evidenció en los aislados

B, D y G. En AN y CLA no se observaron variaciones culturales significativas, debido a un crecimiento micelial escaso y poco pigmentado, excepto los aislados B y F que desarrollaron una textura algodonosa abundante con tonalidad blanca en AN (Figuras 2, 3, 4).

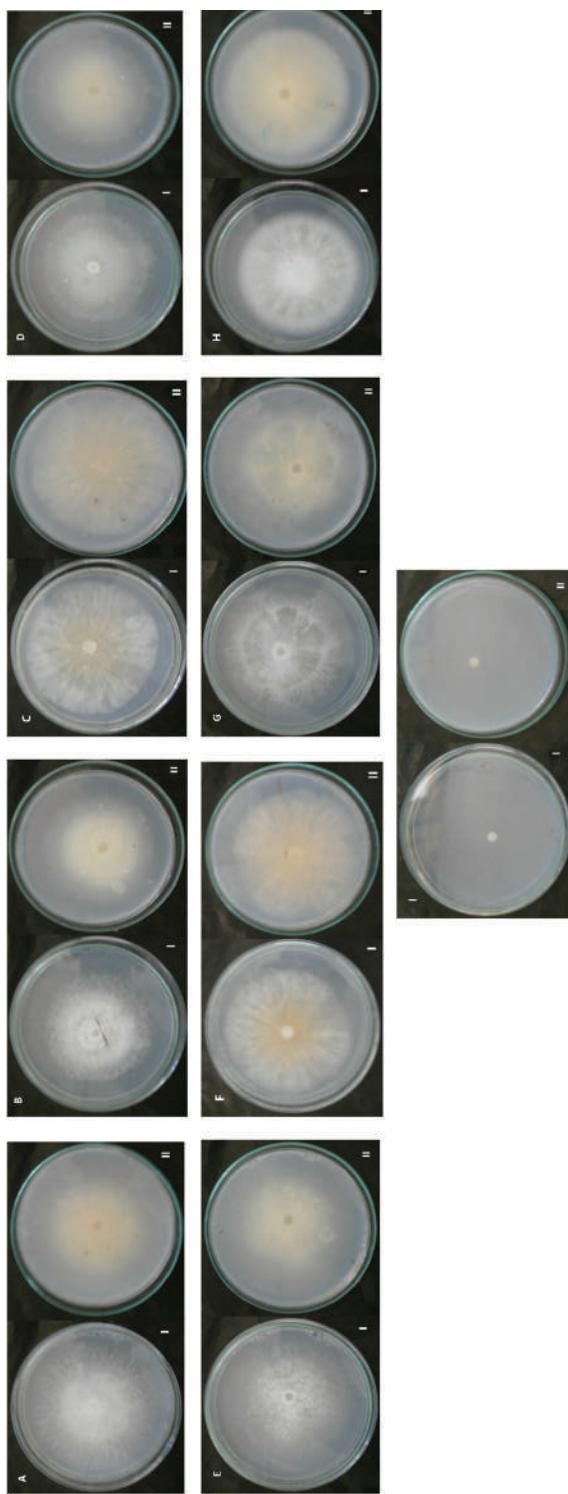


Figura 2. Características culturales de las colonias de 9 aislados de *Fusarium* spp., procedentes de *N. tabacum* en medio SNA (I: anverso, II: reverso).

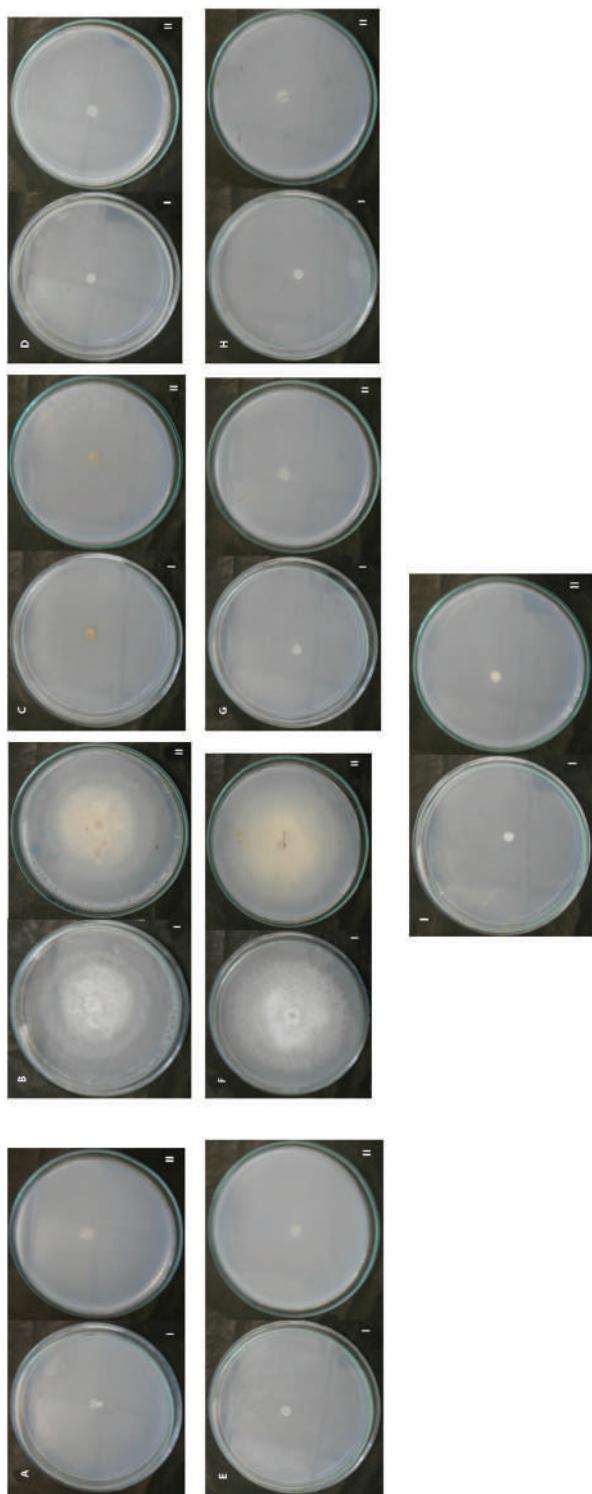


Figura 3. Características culturales de las colonias de 9 aislados de *Fusarium* spp. procedentes de *N. tabacum* en medio AN (I: anverso, II: reverso).

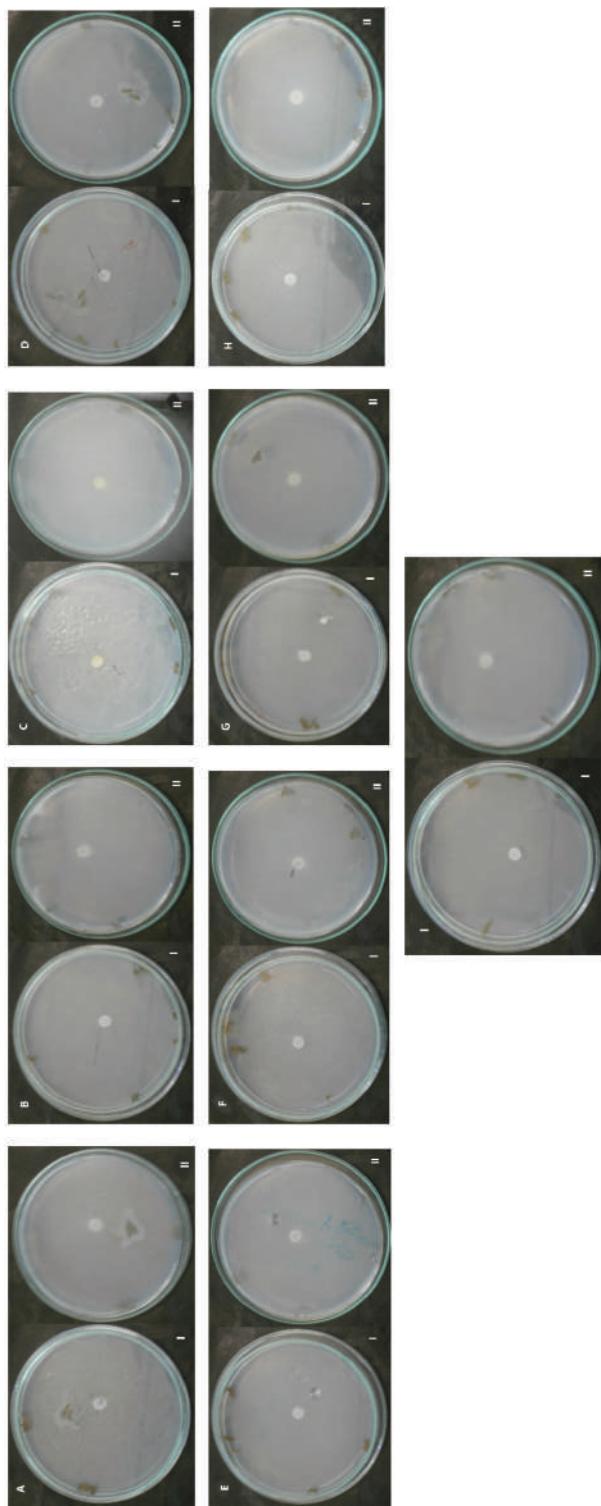


Figura 4. Características culturales de las colonias de 9 aislados de *Fusarium* spp. procedentes de *N. tabacum* en medio CLA a los 7 días (I: anverso, II: reverso).

Finalmente, de esta parte, sobre la base de los resultados alcanzados se consideró al medio PDA como el más idóneo para la caracterización cultural de especies de *Fusarium* procedentes de *N. tabacum*, debido a una mayor variabilidad cultural y pigmentación.

Caracterización morfométrica de los aislados de *Fusarium* spp. Al analizar la velocidad media de crecimiento se constataron

diferencias (Tukey $p \leq 0,05$) entre aislados en los diferentes medios de cultivo evaluados. La mayor velocidad media se alcanzó en los medios CLA y PDA, mientras que la menor se obtuvo en los medios AN y SNA. Los aislados A, B, C y E mostraron una mayor velocidad media en PDA y CLA, respectivamente, así como el aislado F en CLA, mientras que registraron la menor velocidad media D, G y H en PDA y H e I en CLA (Tabla 2).

Tabla 2. Variabilidad de la velocidad media de crecimiento de los aislados de *Fusarium* spp. provenientes de *N. tabacum*.

Aislados	Velocidad media de crecimiento (mm.h ⁻¹)			
	PDA	SNA	CLA	AN
A	0,66 i	0,53 abcdefgh	0,60 fghi	0,52 abcdef
B	0,66 i	0,53 abcdefgh	0,60 fghi	0,52 abcdef
C	0,63 hi	0,53 abcdefgh	0,58 defghi	0,53 abcdefgh
D	0,53 abcdefgh	0,62 ghi	0,55 bcdefgh	0,51 abcdef
E	0,65 i	0,53 abcdefgh	0,62 ghi	0,50 abcde
F	0,55 bcdefgh	0,62 ghi	0,60 efghi	0,50 abcd
G	0,53 abcdefgh	0,58 cdefghi	0,55 bcdefgh	0,53 abcdefgh
H	0,45 a	0,53 abcdefgh	0,53 abcdefgh	0,44 a
I	0,53 abcdefgh	0,48 abc	0,53 abcdefg	0,47 ab
ES		0,01		

Medios de cultivos: PDA =Papa Dextrosa Agar, SNA = Spezieller Nährstofffarmer Agar, CLA = Agar Hojas de clavel, AN = Agar Nutriente, ES = Error Estándar. Letras distintas en las columnas indican diferencias significativas (Tukey $p \leq 0,05$).

Al analizar la concentración de macroconidios se observó diferencias significativas (Tukey $p \leq 0,05$) entre aislados en los diferentes medios de cultivo evaluados. La mayor concentración de macroconidios por aislado

se cuantificó en los medios PDA y SNA, y la menor se obtuvo en CLA y AN. Los aislados A, B, C, D, E, F, G e I mostraron mayor esporulación en PDA, mientras que en SNA fueron B, C, D, E, F y H (Tabla 3).

Tabla 3. Concentración de macroconidios de los aislados de *Fusarium* spp. provenientes de *N. tabacum*.

Aislados	Concentración ($\times 10^6$ macroconidios. mm^{-2})							
	PDA		SNA		CLA		AN	
	\bar{X}	Xt	\bar{X}	Xt	\bar{X}	Xt	\bar{X}	Xt
A	0,75	5,87 hijk	0,10	4,98 efghij	0,001	3,08 a	0,002	3,23 ab
B	1,03	6,01 ijk	1,60	6,20 jk	0,06	4,17 abcde	0,54	5,73 ghijk
C	0,91	5,96 hijk	2,38	6,38 k	0,01	3,96 abcde	0,01	3,79 abcde
D	1,19	6,08 ijk	0,78	5,89 hijk	0,01	4 abcde	0,01	4,00 abcde
E	0,34	5,51 fghijk	1,17	6,07 ijk	0,06	4,54 cdefg	0,004	3,60 abcd
F	1,19	6,08 ijk	0,89	5,55 fgihjk	0,03	4,43 bcdef	1,10	6,04 ijk
G	0,89	5,95 hijk	0,06	4,76 defgh	0,16	4,14 abcde	0,003	3,28 abc
H	0,09	4,92 efghi	0,28	5,44 fgihjk	0,28	4,08 abcde	0,01	4,11 abcde
I	0,31	5,49 fghijk	0,05	3,85 abcde	0,01	3,87 abcde	0,005	3,63 abcd
ES				0,04				

Medios de cultivos: PDA = Papa Dextrosa Agar, SNA = Spezieller Nährstofffarmer Agar, CLA = Agar Hojas de clavel, AN = Agar Nutriente, ES = Error Estándar.

\bar{X} valor promedio, Xt = valor transformado $\text{LOG}(x+1)$. Letras distintas en las columnas indican diferencias significativas (Tukey $p \leq 0,05$).

El análisis cultural y morfométrico posibilitó la determinación de 5 especies de *F. oxysporum* (A, B, C, D, H) y 4 de *F. phyllophylum* (I, E, F, G) (Tabla 4). Todos los aislados de *F. oxysporum* presentaron esporodoquios, sin embargo, los aislados de *F. phyllophylum* no mostraron esta estructura, a excepción del aislado G. Los macroconidios *F. oxysporum* mostraron una longitud que osciló entre 8,17-33,35 μm , mientras que el ancho fluctuó entre 1,45-6,30 μm , con formas semicurva y recta a ligeramente semicurva. Se observaron células apicales con forma

curvada y ligeramente curvada, mientras que las células basales se mostraban ligeramente alargadas y alargadas en forma de pie, los macroconidios de esta especie presentaron 3 septos. Los macroconidios de *F. phyllophylum* registraron un largo que osciló entre 6,68-20,10 μm , mientras que, el ancho fluctuó entre 1,42-4,67 μm con formas semicurva y recta a ligeramente semicurva, se observaron células apicales redondeadas, las células basales mostraron forma ligeramente redondeada, los macroconidios presentaron de 1-3 septos (Figura 5).

Tabla 4. Especies de *Fusarium* asociadas a *N. tabacum* identificadas mediante caracteres culturales-morfométricos. Provincia Granma, Cuba.

Aislados	Especies	Macroconidios				
		Esporodoquio	Talla (μm)	Forma	Célula apical	Célula basal
A		Presente	8,17-18,32 x 2,73-6,30	Semicurvo	Ligeramente curvada	Ligeramente alargada
B	<i>Fusarium oxysporum</i>	Presente	19,64-33,35 x 2,20-4,63	Semicurvo	Curvada	Ligeramente alargada
C	<i>Schlechtendahl</i> emend. Snyder & Hansen	Presente	12,96-24,00 x 1,45-3,57	Semicurvo	Ligeramente curvada	Alargada en forma de pie
D		Presente	18,29-28,26 x 2,08-5,51	Semicurvo	Ligeramente curvada	Ligeramente alargada
H		Presente	8,87-22,15 x 1,82-4,53	Recto a ligeramente semicurvo	Ligeramente curvada	Ligeramente alargada
I	<i>Fusarium phyllophilum</i> Nirenberg & O'Donnell (Sinónimo común <i>Fusarium proliferatum</i> var. <i>minus</i>)	Ausente	6,68-20,10 x 1,99-4,33	Recto a ligeramente semicurvo	Redondeada	Ligeramente redondeada
E		Ausente	7,00-11,36 x 1,82-4,67	Semicurvo	Redondeada	Ligeramente redondeada
F		Ausente	7,14-11,63 x 1,42-3,57	Semicurvo	Redondeada	Ligeramente redondeada
G		Presente	6,91-15,49 x 2,82-4,67	Recto a ligeramente semicurvo	Redondeada	Ligeramente redondeada

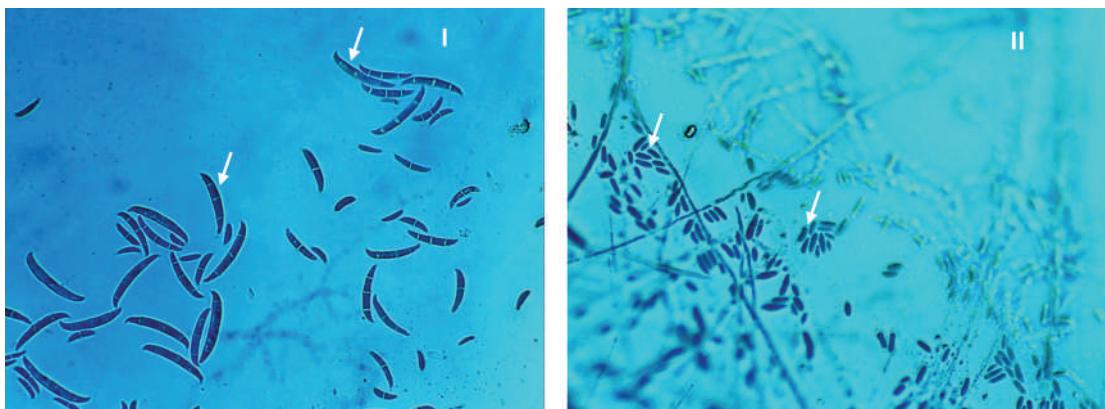


Figura 5. Forma de los macroconidios I (*F. oxysporum* aislado B) y II (*F. phyllophylum* aislado G) crecidos en medio CLA, observados a 40x.

Los microconidios de *F. oxysporum* y *F. phyllophylum* no presentaron septos. Estas estructuras en la especie *F. oxysporum* se mostraron de forma arriñonada, menos el aislado C que manifestó una apariencia oval, mientras que, en *F. phyllophylum* se exhibieron fusiformemente

(Tabla 5). Se observó la presencia de células conidiógenas monofílides en todos los aislados de ambas especies. Las clamidosporas se observaron individualmente en los aislados de *F. oxysporum*. Ambas especies presentaron un micelio aéreo en falsas cabezas.

Tabla 5. Especies de *Fusarium* asociadas a *N. tabacum* identificadas por caracteres culturales-morfométricos. Provincia Granma, Cuba.

Aislado	Especie identificada	Microconidio		Otros caracteres morfológicos		
		Forma	Septo	Célula conidiógena	Clamidosporas	Micelio aéreo
A		Arriñonada	0	Monofáliides	Individualmente	Falsas cabezas
B		Arriñonada	0	Monofáliides	Individualmente	Falsas cabezas
C	<i>Fusarium oxysporum</i> Schlechtendahl emend. Snyder & Hansen	Oval	0	Monofáliides	Individualmente	Falsas cabezas
D		Arriñonada	0	Monofáliides	Individualmente	Falsas cabezas
H		Arriñonada	0	Monofáliides	Individualmente	Falsas cabezas
I		Fusiforme	0	Monofáliides	-	Falsas cabezas
E	<i>Fusarium phyllophilum</i> Nirenberg & O'Donnell (Sinónimo común <i>Fusarium</i> <i>proliferatum</i> var. <i>minus</i>)	Fusiforme	0	Monofáliides	-	Falsas cabezas
F		Fusiforme	0	Monofáliides	Individualmente	Falsas cabezas
G		Fusiforme	0	Monofáliides	Individualmente	Falsas cabezas

Los resultados obtenidos en esta investigación poseen importancia para el programa nacional de selección y mejoramiento de variedades de *N. tabacum* tolerantes a *Fusarium* spp., muestran una alta especificación de *F. oxysporum* y *F. phyllophylum* como especies fitopatógenas asociadas a *N. tabacum* y evidencian los riesgos potenciales de proliferación del fitopatógeno en agroecosistemas tabacaleros.

DISCUSIÓN

En el medio PDA no se observó gran variabilidad cultural, lo cual pudo ser atribuido a la poca biodiversidad de especies presentes. Al respecto Tapia y Amaro (2014) y Rentería-Martínez *et al.* (2019) expresaron que aislados de *Fusarium* spp., crecidos en PDA mostraron una amplia diversidad de coloraciones, entre ellas café, rojo, violeta, naranja, gris y blanco. Las personas autoras constatan que dicha variabilidad se debió a la alta biodiversidad de especies presentes y observadas durante la investigación. Se conoce que la pigmentación del micelio puede deberse a la disponibilidad de nutrientes y al pH del medio de cultivo. Por su parte, Quilambaqui (2005) y Duarte *et al.* (2016) informaron que especies de *Fusarium* mostraron coloraciones del micelio violeta, púrpura, violáceo, amarillento, blanquecino, rojo ladrillo y rosa salmón en medio PDA a un pH de 6, tal variabilidad no fue observada en el presente estudio.

Los medios SNA, CLA y AN poseen baja concentración de nutrientes y de péptidos, lo cual pudo incidir sobre la pigmentación y el desarrollo de los aislados. Al respecto, Hernández Amasifuen *et al.* (2019) y Almaraz-Sánchez *et al.* (2018) informaron que medios pobres en nutrientes influyeron sobre la coloración y la formación de estructuras fúngicas de *Fusarium* spp., lo expuesto coincidió con el resultado obtenido en la presente investigación, donde se puso de manifiesto una escasa coloración del micelio fúngico.

La máxima velocidad media de crecimiento observada, pone de manifiesto una asimilación diferencial de los nutrientes por los aislados en cada medio de cultivo y se relaciona con la capacidad de colonización de este hongo en suelos y sustratos. Los resultados coinciden con lo informado por Dueñas *et al.* (2007), quienes expresaron que los aislados de *Fusarium* spp., obtenidos de *Cicer arietinum* mostraron un rápido crecimiento en medio PDA. Más recientemente Duarte *et al.* (2016) expusieron que aislados de *Fusarium* spp. procedentes de *C. arietinum* alcanzaron la mayor velocidad de crecimiento $0,63 \text{ mm.h}^{-1}$ en medio Czapek Dox. En la presente investigación la mayor velocidad de crecimiento registrada por los aislados de *Fusarium* pudiera relacionarse con una rápida colonización de estos aislados en el suelo y sobre su hospedante vegetal.

La concentración de macroconidios constatada en esta investigación es mayor a los resultados obtenidos por Duarte *et al.* (2016) en especies de *F. oxysporum* aisladas de *C. arietinum*, los cuales registraron una esporulación entre $0,06-0,32 \times 10^6$ macroconidios. mm^{-2} , mientras que en *F. phyllophylum* obtuvieron $0,34 \times 10^6$ macroconidios. mm^{-2} en medio PDA. En otros estudios, Lazarotto *et al.* (2014) y Almaraz-Sánchez *et al.* (2018) evidenciaron que en aislados de *Fusarium* spp., se alcanzó un rango de esporulación entre $1,20-2,94 \times 10^6$ macroconidios. mL^{-1} , dichos resultados fueron similares a los obtenidos en el presente estudio.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se consideró que la variabilidad de los macroconidios en cuanto a su morfología, características de las células apicales y basales, su tamaño y la formación de septos, los reafirma como la principal estructura para la identificación de especies de *Fusarium*. Al respecto, Leyva-Mir *et al.* (2017) informaron que en una caracterización de especies de *Fusarium* obtenidas del trigo se desarrollaron macroconidios con una talla de $24-33 \times 2-2,3 \mu\text{m}$ con 3 septos, célula apical curvada y basal ligeramente alargada, con micelio de coloración púrpura-violeta; mientras

que, en aislados que obtuvieron una coloración blanca-amarillenta registraron un tamaño de 22-48 x 2,5-4,2 μm . Por su parte, Duarte *et al.* (2016) registraron un tamaño de macroconidios de 11,04-39,22 μm de largo y 1,01-4,14 μm de ancho en *F. oxysporum*, lo cual coincidió con las características morfométricas de los aislados analizados en esta investigación.

Se considera que la variabilidad de los microconidios en cuanto a su forma, tamaño y presencia de septos posee una relación con el medio de cultivo donde crece y con la especie en cuestión. Al respecto, Leslie y Summerell (2008), Cardona-Piedrahita y Castaño-Zapata (2019) informaron que los aislados de *F. oxysporum* mostraron microconidios en forma oval y arriñonados, células conidiógenas monofílides, microconidios en falsas cabezas y cladidosporas individualmente, lo cual coincidió con lo observado en el presente estudio. En este mismo sentido, Duarte *et al.* (2016) informaron que los microconidios de *F. phyllophylum* procedentes de *C. arietinum* mostraron de 0-1 septos y una apariencia fusiforme, similar a lo descrito en esta investigación.

CONCLUSIONES

Se caracterizan eficazmente por el método combinado cultural-morfométrico 9 aislados de *Fusarium* spp., (5 de *F. oxysporum* y 4 de *F. phyllophylum*). La caracterización cultural evidenció una mayor variabilidad de la pigmentación en el medio PDA en comparación con los restantes medios, mientras que, la morfométrica demostró una diferenciación inter e intraespecífica en la formación de estructuras microscópicas, lo que verificó una talla de macroconidios que oscila entre 8,17-33,35x1,45-6,30 μm en *F. oxysporum* y de 6,68-20,10x1,42-4,67 μm en *F. phyllophylum*. Lo expuesto, evidencia la selectividad de estas dos especies por *N. tabacum* y señala la necesidad de monitorear la fitopatogenecidad de este patógeno con el propósito de establecer su correspondiente manejo.

LITERATURA CITADA

- Almaraz-Sánchez, A; Ayala-Escobar, V; Tlatilpa-Santamaría, IF; Nieto-Ángel, D. 2018. *Fusarium sambucinum* Fuckel agente causal de la pudrición de frutos de chile manzano (*Capsicum pubescens*) en México. Rev. Mex. Fitopatol 37(1):159-169. DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1810-2>.
- Barceló, AM; Mustelier, MR. 2019. Insectos nocivos asociados al cultivo del tabaco al sol (*Nicotiana tabacum*, L.) en una zona agroproductiva de la provincia de Las Tunas, Cuba. Rev. Dig. Med. Amb. “Ojeando la Agenda” 60(4):44-66.
- Calero-Hurtado, A; Quintero-Rodríguez, E; Olivera-Vicedo, D; Peña-Calzada, K; Pérez-Díaz, Y. 2019. Influencia de dos bioestimulantes en el comportamiento agrícola del cultivo del tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). Rev. Fac. Cien. Méd 8(1):31-44.
- Cardona-Piedrahita, LF; Castaño-Zapata, J. 2019. Comparison of inoculation methods of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Sacc.(Snyder & Hansen), the causal agent of the vascular wilt of tomato. Rev. Acad. Colomb. Cienc. Exactas Fis. Nat 43(167):227-233. DOI: <https://doi.org/10.18257/raccefn.854>.
- Castro López, W; Carrera Sánchez, K; Herrera Isla, FL; Cupull Santana, R. 2018. Identificación de aislados de *Fusarium* spp. asociados a *Solanum quitoense* Lam en Pastaza, Ecuador. Ctro. Agr 45(4):5-11.
- Duarte, Y; Echevarría Hernández, A; Martínez Coca, B. 2016. Identificación y caracterización de aislamientos de *Fusarium* spp. presentes en garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en Cuba. Rev. Protección Veg 31(3):173-183.
- Dueñas, G; Shagarodsky, T; Fresneda, J; Hernández, F; González, J. 2007. Caracterización del género de especies de *Fusarium* en el cultivo del garbanzo (*Cicer arietinum*) en las provincias ciudad Habana y La Habana. Rev. Protección Veg 11(32):63-66.
- González, LM; Flores, FG; García, BM; Rivera, SG; Vázquez, FPG; Gallegos, JAA; Guerra, RR; Williamson, JS; Enciso, MC; Elos, MM. 2005. Especies de *Fusarium* presentes en raíces de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) con daños de pudrición, en cinco estados del centro de México. Rev. Mex. Fitopatol 23(1):1-7.
- Hernández Amasifuen, AD; Pineda Lázaro, AJ; Noriega-Córdova, HW. 2019. Aislamiento e identificación de *Fusarium oxysporum* obtenidos de zonas productoras de “ají paprika” (*Capsicum annuum* L. (*Solanaceae*)) en el distrito de Barranca, Perú. Arnaldoa 26(2):689-698.
- Lazarotto, M; Milanesi, PM; Muniz, MFB; Reiniger, LRS; Beltrame, R; Harakava, R; Blume, E. 2014. Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp pathogenic to pecan tree in Brazil.

- Genet. Mol. Res 13(4):9390-9402. DOI: <https://doi.org/10.4238/2014>.
- Leslie, JF; Summerell, BA. 2008. The Fusarium laboratory manual. Iowa, USA, John Wiley & Sons. 280 p.
- Leyva-Mir, SG; Vega-Portillo, HE; Villaseñor-Mir, HE; Tlapal-Bolaños, B; Vargas-Hernández, M; Camacho-Tapia, M; Tovar-Pedraza, JM. 2017. Caracterización de especies de *Fusarium* causantes de pudrición de raíz del trigo en el Bajío, México. Chil. J. Agric. Anim. Sci 33(2):142-151.
- Quilambaqui, MA. 2005. Aislamiento e identificación de especies de *Fusarium* spp asociadas al declinamiento del espárrago (*Asparagus officinalis* L.) en cinco municipios de Guanajuato, México. ESPOL Ciencia 18(1):135-140.
- Rentería-Martínez, ME; Guerra-Camacho, M; Ochoa-Meza, A; Moreno-Salazar, F; Meza-Moller, AC; Guzmán-Ortíz, JM. 2019. Description and comparison among morphotypes of *Fusarium brachygibbosum*, *F. falciforme* and *F. oxysporum* pathogenic to watermelon in Sonora, México. Rev. Mex. Fitopatol 37(1):16-34. DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1808-1>.
- Retana, K; Ramírez-Coché, JA; Castro, O; Blanco-Meneses, M. 2018. Caracterización morfológica y molecular de *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii* asociado a la marchitez del apio en Costa Rica. Agronomía Costarricense 42(1):115-126.
- Tapia, C; Amaro, J. 2014. Género *Fusarium*. Revista chilena de infectología 31(1):85-86.
- Toledo, V; González, A; Martínez, J. 2016. Estabilidad de *Trichoderma harzianum* cepa A-53 en condiciones no controladas. Su influencia en la enfermedad pata prieta. CUBA TABACO 15(1):3-9.



Todos los derechos reservados. Universidad de Costa Rica. Este artículo se encuentra licenciado con Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Costa Rica. Para mayor información escribir a rac.cia@ucr.ac.cr

Nota técnica

***Pseudomonas* SP EN LA EMERGENCIA DE SEMILLAS Y EL DESARROLLO DE POSTURAS DE CACAO**

Yusdel Ferrás-Negrín¹, Carlos Alberto Bustamante-González², Nosleiby Ortiz-Gómez³*

Palabras clave: Biofertilizante; germinación; semillas peletizadas; cacao; pseudomonas.

Keywords: Biofertilizer; germination; pelleted seeds; cocoa; pseudomonas.

Recibido: 27/01/2021

Aceptado: 09/04/2021

RESUMEN

Introducción. *Pseudomonas* sp como rizobacteria promotora del crecimiento vegetal es muy utilizada en diversos cultivos, ya que promueve el crecimiento y previene la colonización de patógenos. **Objetivo.** Evaluar la influencia de *Pseudomonas* sp en la emergencia de las semillas y el desarrollo de posturas de *Theobroma cacao* L. en suelos fersialíticos pardos rojizo de Jibacoa. **Materiales y métodos.** La investigación se realizó en el 2018 en la Estación Experimental Agro-Forestal de Jibacoa en el municipio Manicaragua, provincia Villa Clara, Cuba. En un diseño de bloques al azar con 3 réplicas, se estudiaron 3 tratamientos: **a-** Control: siembra de semillas en un sustrato compuesto por 3 partes de suelo y una de abono orgánico (3/1); **b-** siembra de semillas en un sustrato 5/1; **c-** sustrato 5/1 con siembra de semillas peletizadas con *Pseudomonas* sp. Se evaluó la emergencia de las semillas y a 10 posturas se le midieron la altura,

ABSTRACT

***Pseudomonas* sp on seed emergency and cocoa seedlings development. Introduction.** *Pseudomonas* sp as a plant growth promoting rhizobacteria is widely used in various crops that promotes growth and prevent pathogen colonization. **Objective.** To evaluate the influence of *Pseudomonas* sp on the emergence of seeds and the development of *Theobroma cacao* L. seedlings in reddish brown fersialitic soils of Jibacoa. **Materials and methods.** The research was carried out in 2018 at the Jibacoa Agro-Forestry Experimental Station in the Manicaragua municipality, Villa Clara province, Cuba. In a randomized block design with 3 replications, 3 treatments were studied: **a-** Control: sowing seeds in a substrate composed of 3 parts of soil and one part of organic fertilizer (3/1); **b-** sowing seeds in a substrate 5/1; **c-** substrate 5/1 with sowing of pelleted seeds with *Pseudomonas* sp. The emergence of the seeds was evaluated and

* Autor para correspondencia. Correo electrónico: yusdel@jibacoa.inaf.co.cu

1 Instituto de Investigaciones Agro-Forestales, Estación Experimental Agro-Forestal Jibacoa, Manicaragua, Villa Clara, Cuba.

 0000-0001-7897-0128.

2 Instituto de Investigaciones Agro-Forestales, Unidad de Ciencia y técnica de Base Cruce de los Baños, Tercer Frente, Santiago de Cuba, Cuba.

 0000-0002-1136-8762.

3 Instituto de Investigaciones Agro-Forestales, Estación Experimental Agro-Forestal Jibacoa, Manicaragua, Villa Clara, Cuba.

 0000-0003-4990-4521.

el diámetro del tallo, la masa seca y el área foliar. **Resultados.** La aplicación de *Pseudomonas* sp a las semillas del cacao en el momento de la siembra incrementó su emergencia en un 14,57% con respecto a las no peletizadas en igual volumen de abono orgánico y en un 4,18% con respecto al tratamiento control. Este biofertilizante aumentó la masa seca y el área foliar en un 18,3% y 37,8% respectivamente en el sustrato 5/1, y en 18,3% y 46,9% de igual manera con respecto al tratamiento control. **Conclusiones.** La aplicación de *Pseudomonas* sp a las semillas del cacao en el momento de la siembra provoca efectos positivos en la emergencia y el desarrollo de las posturas de cacao al aumentar su peso seco y área foliar.

the height, stem diameter, dry mass and leaf area were measured at 10 positions. **Results.** The application of *Pseudomonas* sp to cocoa beans at the time of sowing increased their emergence by 14.57% with respect to those not pelleted in the same volume of organic fertilizer and by 4.18% with respect to the control treatment. This biofertilizer increased the dry mass and leaf area by 18.3% and 37.8% respectively in the 5/1 substrate, and by 18.3% and 46.9% in the same way with respect to the control treatment. **Conclusions.** The application of *Pseudomonas* sp to the seeds at the time of sowing causes positive effects in the emergence and development of the seedlings by increasing their dry weight and leaf area.

INTRODUCCIÓN

Pseudomonas fluorescens como rizobacteria promotora del crecimiento vegetal es muy utilizada en diversos cultivos, ya que colonizan las raíces, promueven el crecimiento y previenen el establecimiento de patógenos. También favorecen la capacidad de absorción de agua y nutrientes, lo que permite que las plantas sean más vigorosas, productivas y tolerantes a condiciones climáticas adversas (Pérez *et al.* 2015).

Pseudomonas fluorescens se destaca por la producción de sustancias estimuladoras del crecimiento, fundamentalmente hormonas como las auxinas, giberelinas y citoquininas. La producción de estas sustancias se hace posible siempre y cuando sea adecuada la densidad de organismos en el sistema radicular y que en el suelo haya suficiente cantidad de materia orgánica (Pérez *et al.* 2015).

En la literatura se evidencian resultados positivos del empleo de *Pseudomonas fluorescens* en procesos germinativos de semillas y en el desarrollo de varios cultivos tales como el trébol criollo (*Lotus corniculatus*) (Pérez *et al.*

2000), tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) (Carrillo *et al.* 2000), lechuga (*Lactuca sativa* L) (Díaz *et al.* 2001), arveja (*Pisum sativum* L.) (Guerra *et al.* 2011).

Para la cacaocultura cubana actual no se dispone de los fertilizantes minerales necesarios para garantizar el adecuado desarrollo de las posturas. Esta situación de conjunto con el déficit de abonos orgánicos para la confección de las mezclas de los sustratos, realza la importancia de la utilización de los biofertilizantes y bioestimulantes como alternativas ecológicas y económicamente sostenibles (Bustamante y Rojas 2017).

Se dispone de conocimientos sobre el efecto benéfico de biofertilizantes como Azotobacter, abonos verdes, Azospirillum y bioestimulantes sintéticos, principalmente para el cultivo del cafeto (*Coffea arabica* L.) en la fase de viveiro. Sin embargo, por diversas razones su uso no está extendido o no se ha investigado lo suficiente para el cultivo del cacao (*Theobroma cacao* L.) (Bustamante y Rojas 2017). Por tales motivos, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la influencia del biofertilizante *Pseudomonas* sp en la emergencia de las semillas y el desarrollo de

posturas de cacao en suelos fersialíticos pardos rojizo de Jibacoa, Cuba.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el 2018 en la Estación Experimental Agro-Forestal de Jibacoa en el municipio Manicaragua, provincia Villa Clara, Cuba, perteneciente al Instituto de Investigaciones Agro-Forestales.

Se analizaron los tratamientos, en un diseño de bloques al azar con 3 réplicas, dispuestas de la siguiente forma:

1. Control: correspondió al sustrato conformado por 3 partes de suelo y una de abono orgánico procedente de pulpa de café (3/1) y siembra de semillas de cacao sin peletizar.
2. Sustrato conformado por 5 partes de suelo y una de abono orgánico procedente de

pulpa de café (5/1) y siembra de semillas de cacao sin peletizar.

3. Sustrato 5/1 y siembra de semillas de cacao peletizadas con *Pseudomonas* sp.

Cada tratamiento estuvo representado por 99 bolsas de 14 cm de ancho por 24 cm de alto; en cada una se sembró una semilla de cacao procedente de una plantación híbrida.

Se utilizó *Pseudomonas* sp con título 1,2 x 10⁹ UFC. La aplicación del biofertilizante se realizó después de retirar el mucilago de las semillas de cacao con arena de río, con una dosis del 10% del peso de las semillas, es decir 10 g del biofertilizante por cada 100 g de semillas, e inmediatamente después de la inoculación se sembraron. Se utilizó malla sarán con entrada de luz al 50%.

Para los sustratos se utilizó un suelo fersialítico pardo rojizo (Hernández *et al.* 1999) y abono orgánico procedente del compostaje de la pulpa de café (*Coffea arabica* L). Las mezclas preparadas se caracterizaron por tener buena fertilidad (Tabla 1).

Tabla 1. Características agroquímicas de los sustratos utilizados (media de 3 muestras).

Sustratos	M.O, %	pH, KCL	P ₂ O ₅	K ₂ O	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺
			mg 100 g ⁻¹ de suelo		Cmol.kg ⁻¹	
5/1	10,53	6,58	74,2	29,01	15,60	4,00
3/1	10,78	6,68	77,84	30,19	15,73	5,20

En el momento de la germinación se evaluó el porcentaje de semillas emergidas.

A los 150 días posteriores a la siembra, a 10 posturas se les evaluaron: la altura de la planta (cm), el diámetro del tallo (cm), la masa seca de las posturas (g) y el área foliar según la metodología propuesta por Navarro *et al.* (1998).

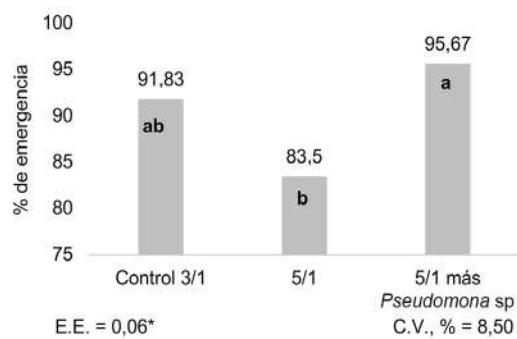
Los porcentajes de emergencia de las semillas fueron transformados a arcoseno \sqrt{p}

para el procesamiento estadístico. En los resultados del trabajo se muestran los valores medios sin transformar.

Los datos fueron sometidos a la prueba de normalidad y homogeneidad de varianza. La comparación de las medias se realizó mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan. El procesamiento estadístico de los datos se realizó con el programa InfoStat versión 1.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La emergencia de las semillas de cacao osciló entre el 83,50% y 95,67% (Figura 1). López y Gil (2017) obtuvieron 71,1% de emergencia en sustratos conformados por arena previamente desinfección con lejía al 2% y solarización.



*Barras con letras diferentes difieren según prueba de Duncan para $p \leq 0,05$.

Figura 1. Influencia de *Pseudomonas* sp en la emergencia de las posturas de cacao.

La aplicación de *Pseudomonas* sp a las semillas del cacao en el momento de la siembra influyó positiva y significativamente en su emergencia, al incrementarse esta en un 14,57% en comparación a las no peletizadas en igual volumen de abono orgánico. El tratamiento 5/1 más la aplicación de la rizobacteria, no difirió del tratamiento control, lo cual justifica su aplicación

en sustratos con menores volúmenes de abono orgánicos (proporción 5/1) en caso de que exista poca disponibilidad de los mismos.

Los resultados indicaron el efecto estimulador que provocan las aplicaciones de *Pseudomonas* sp en la emergencia de las semillas. En este sentido Guerra *et al.* (2011) obtuvieron incrementos significativos de un 5,47% en la germinación de las semillas en 4 variedades de arveja al sembrarlas inoculadas con este biofertilizante respecto a la variante no tratada.

Díaz *et al.* (2001) obtuvieron incrementos en un 35,9% de la germinación en semillas de lechuga al inocular *Pseudomonas fluorescens*. En la lenteja (*Lens esculenta* Moench.), dichas personas autoras informaron incrementos en la germinación de hasta el 38,9% en estudios realizados con nueve cepas de *Pseudomonas* sp.

Entre el sustrato 3/1 y 5/1 sin la inoculación de *Pseudomonas* sp no existieron diferencias significativas, pero donde existió mayor volumen de abono orgánico la germinación fue un 9,97% superior. Resultados que pueden estar relacionados a lo expresado por Hernández *et al.* (2010) al referirse que el abono orgánico es un inoculante microbiano que favorece la germinación.

Se pudo constatar que la proporción suelo-abono orgánico no influyó en el desarrollo de las posturas al no presentar diferencias las medias de los indicadores morfo-fisiológicos evaluados (Tabla 2). Estos resultados pudieron estar asociados a la similar fertilidad que tuvieron ambos sustratos.

Tabla 2. Influencia de *Pseudomonas* sp en los indicadores morfo-fisiológicos de las posturas de cacao a los 150 días después de la siembra.

Nº	Tratamientos	Altura cm	Diámetro tallo cm	Peso seco g	Área foliar cm ²
1	Control (3/1)	41,84	0,67	6,71 b	594,6 b
2	5/1	42,34	0,65	6,71 b	633,73 b
3	5/1 más semillas peletizadas con <i>Pseudomonas</i> sp	44,1	0,63	7,94 a	873,52 a
	E.E.	0,72 ns	0,01 ns	0,27**	37,59**
	C.V., %	5,36	5,23	12,18	16,97

** Medias con letras diferentes en una misma columna difieren para $p \leq 0,01$; ns no es significativo para $p \leq 0,05$.

La inoculación de *Pseudomonas* sp a las semillas de cacao en el momento de la siembra sí incrementó el desarrollo de las posturas de forma significativa. Con la aplicación de esta bacteria se aumentó el peso seco y el área foliar de las posturas en un 18,3% y 37,8% respectivamente en igual sustrato, y en comparación al tratamiento control los incrementos fueron de un 18,3% y 46,9% de la misma manera. La altura y el diámetro del tallo no manifestaron diferencia entre los tratamientos.

Díaz *et al.* (2001) obtuvieron incrementos de un 202,7%, 171,4%, 63,6% de área foliar, de peso seco aéreo y volumen de la raíz, respectivamente en el cultivo de la lechuga al inocular *Pseudomonas fluorescens*.

Pérez *et al.* (2000) al inocular la cepa UP143 de *Pseudomonas fluorescens* en las semillas de *Lotus corniculatus* L. cv. San Gabriel, obtuvieron incrementos en el peso seco total en un 100%, 45% y 33% para 1996, 1997 y 1998, respectivamente en comparación al testigo sin inocular.

Según Carrillo *et al.* (2000) *Pseudomonas fluorescens* es conocida ampliamente por su capacidad de promover el desarrollo de las plantas, estas personas autoras en su investigación en el cultivo del tomate obtuvieron que las parcelas inoculadas con los aislados de *Pseudomonas fluorescens* tuvieron las plantas de mayor producción, las de mayor altura y las más tempranas en cuanto a floración.

Pseudomonas fluorescens acelerará el crecimiento de las plantas por la síntesis de hormonas como auxinas, giberelinas, citoquininas, aminoácidos y promotores específicos del crecimiento (Leal *et al.* 2018).

CONCLUSIONES

La aplicación de *Pseudomonas* sp a las semillas del cacao en el momento de la siembra provocó efectos positivos en la emergencia y el desarrollo de las posturas al aumentar su peso

seco y área foliar en el tratamiento 5/1 en semillas paletizadas con *Pseudomonas* sp.

LITERATURA CITADA

- Bustamante, CA; Rojas, M. 2017. Efecto de las cepas de micorrizas y la riqueza del sustrato en el crecimiento de posturas de *Theobroma cacao* L. y los índices de utilización de nutrientes. *Café y Cacao* 16(1):22-34.
- Carrillo, G; Juárez, J; Ruiz, D; Müller, R. 2000. Aumento del rendimiento de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) cuando la raíz se desarrolla colonizada por microorganismos (en línea). *Biotecnología Aplicada* 17(3):171-176.
- Díaz, P; Ferrera, R; Almaraz, JJ; Alcántar, G. 2001. Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga (en línea). *Terra Latinoamericana* 19(4):327-335. Consultado 23 may. 2019. Disponible en <http://www.redalyc.org/pdf/573/57319405.pdf>
- Guerra, GA; Betancourt, CA; Salazar, CE. 2011. Antagonismo de *Pseudomonas fluorescens* Migula frente a *Fusarium oxysporum* fsp. pisi Schtdl en arveja *Pisum sativum* L (en línea). *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient.* 14(2):33-42. Consultado 22 may. 2019. Disponible en <http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v14n2/v14n2a04.pdf>
- Hernández, A; Cabrera, A; Ascanio, M; Morales, M; Rivero, L; Martín, N; Baisre, J; Frómeta, E. 1999. Nueva Versión de Clasificación de los Suelos de Cuba. Instituto de Suelos. Ciudad Habana, CUBA, Ministerio de la Agricultura. 64 p.
- Hernández, OA; Ojeda, DL; López, JC; Arrás, AM. 2010. Abonos orgánicos y su efecto en las propiedades físicas químicas y biológicas del suelo (en línea). *Tecnociencia Chihuahua* 4(1):1-6. Consultado 21 dic. 2020. Disponible en http://tecnociencia.uach.mx/numeros/v4n1/data/Abonos_organicos_y_su_efecto_en_las_propiedades_fisicas_quimicas_biologicas_del_suelo.pdf
- Leal, J; Gutiérrez, MA; Castro, L; Lares, F; Cortes, JM; De los Santos, S. 2018. Microorganismos promotores de crecimiento vegetal con yeso agrícola en papa (*Solanum tuberosum* L.) bajo casa sombra (en línea). *Agrociencia* 52(8):1149-1159.
- López, SE; Gil, AE. 2017. Características germinativas de semillas de *Theobroma cacao* L. (Malvaceae) “cacao” (en línea). *Arnaldoa* 24(2):609-618.
- Navarro, D; González, JA; Bustamante, C; Grave de Peralta, G. 1998. Método de estimación de área foliar en posturas de *Theobroma cacao* a partir de las medidas lineales de las hojas. *Café y Cacao* 1(1):46-49.

- Pérez, C; De La Fuente, L; Arias, A; Altier, N. 2000. Uso de *Pseudomonas fluorescens* nativas para el control de enfermedades de implantación en *Lotus corniculatus* L. (en línea). Agrociencia 4(1):41-47. Consultado 25 may. 2019. Disponible en <http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/publica/Pseudomonas%20fluorescetes.pdf>
- Pérez, S; Coto O; Echemendía, M; Ávila, G. 2015. *Pseudomonas fluorescens* Migula, ¿Control biológico o patógeno? (en línea). Rev. Protección Veg 30(3):225-234. Consultado 29 dic. 2018. Disponible en <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v30n3/rpv08315.pdf>



Todos los derechos reservados. Universidad de Costa Rica. Este artículo se encuentra licenciado con Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Costa Rica. Para mayor información escribir a rac.cia@ucr.ac.cr

Nota técnica

SERVICIO ECOSISTÉMICO DE REGULACIÓN DE UN BOSQUE DE GALERÍA DEL ARROYO SAN LORENZO, PARAGUAY

Maura Isabel Díaz-Lezcano^{1/}, Manuel David Rodríguez-Benítez²,
Higinio Moreno-Resquín³, Cristian Andrés Britos-Benítez⁴*

Palabras clave: Composición florística; estimación de carbono; nutrientes del suelo; velocidad de infiltración; servicio ecosistémico.

Keywords: Floristic composition; carbon estimation; soil nutrients; infiltration rate; ecosystem service.

Recibido: 17/05/2021

Aceptado: 12/08/2021

RESUMEN

Introducción. Los bosques son los ecosistemas terrestres más diversos y cumplen funciones ambientales y ecológicas, sociales y económicas, ofrecen beneficios directos e indirectos al entorno, uno de los principales es el servicio de regulación. **Objetivo.** Analizar el servicio ecosistémico de regulación relacionado con el carbono almacenado y el aprovisionamiento de agua y nutrientes del bosque de galería del Arroyo San Lorenzo, Paraguay. **Materiales y métodos.** El trabajo se realizó en el bosque de galería del arroyo San Lorenzo, Paraguay. Fueron establecidas 4 parcelas de 750 m² cada una para el relevamiento de los datos. Las variables estudiadas fueron: la composición florística, las propiedades físicas y químicas del suelo, la velocidad de infiltración media del agua y el carbono acumulado en el estrato arbóreo aéreo, radicular y suelo. **Resultados.** El bosque está constituido por individuos de la familia

ABSTRACT

Ecosystem regulation service for a gallery forest from the San Lorenzo Stream, Paraguay. **Introduction.** Forests are the most diverse terrestrial ecosystems and fulfill environmental and ecological, social and economic functions, offer direct and indirect benefits to the environment, one of the main ones is the regulatory service. **Objective.** Was to analyze the ecosystem service of regulation of a gallery forest of the San Lorenzo stream, Paraguay. **Materials and method.** The research work was carried out in the gallery forest of the San Lorenzo stream, Paraguay. Four plots of 750 m² each were established for data collection. The variables studied were: the floristic composition, the physical and chemical conditions of the soil, the average infiltration rate of the soil and the accumulation of carbon in the aerial, root and soil tree strata. **Results.** The forest is made up of individuals from the Meliaceae, Myrtaceae and

* Autora para correspondencia. Correo electrónico: maura.diaz@agr.una.py

1 Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Agrarias, Ingeniería Forestal, San Lorenzo, Paraguay.

 0000-0003-4629-8255.

2 Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Agrarias, Ingeniería Ambiental, San Lorenzo, Paraguay.

 0000-0002-2872-2262.

3 Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Agrarias, Ingeniería Agronómica, San Lorenzo, Paraguay.

 0000-0003-0058-0351.

4 Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Agrarias, Ingeniería Agronómica, San Lorenzo, Paraguay.

 0000-0001-6496-734X.

Meliaceae, Myrthaceae y Moraceae y en menor cantidad de especies se encuentran Cecropiaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Rhamnaceae y la Sapotaceae. El carbono arbóreo almacenado fue de 38,4 tC.ha⁻¹ y el del suelo (COS) fue de 31,08 tC.ha⁻¹. El carbono total acumulado en los 2 componentes fue de 69,48 tC.ha⁻¹ y el dióxido de carbono equivalente de 254,81 tCO₂e.ha⁻¹. El suelo es anegado y poco aireado, con baja conductividad hidráulica a partir de los 50 cm de la superficie y la velocidad de infiltración del agua fue de 66 mm.h⁻¹. **Conclusión.** El bosque de galería ofrece servicios de captación de carbono, lo que constituye la biomasa arbórea el mayor reservorio de carbono, provisión de agua para la conservación y fuente del aprovisionamiento de nutrientes del suelo de la sub cuenca del arroyo San Lorenzo, Paraguay.

Moraceae families. In fewer species are Cecropiaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Rhamnaceae and Sapotaceae. The arboreal carbon stored yielded an average of 38.4 tC.ha⁻¹, as for the soil (COS) component an average of 31.08 tC.ha⁻¹ was presented. The total carbon accumulated in the two components is 69.48 tC.ha⁻¹. The average carbon equivalent obtained is 254.81 tCO₂e.ha⁻¹. The average infiltration rate was 66 mm.h⁻¹. The soil is flooded and little aerated, with low hydraulic conductivity from 50 cm from the surface. **Conclusion.** The gallery forest offers carbon sequestration services, the arboreal biomass what constitutes the largest carbon reservoir, providing water for conservation and source of the supply of soil nutrients in the sub-basin of the San Lorenzo stream, Paraguay.

INTRODUCCIÓN

Uno de los grandes desafíos del nuevo milenio para la humanidad es la mitigación y adaptación al cambio climático. De acuerdo con el avance de las investigaciones referentes a la emisión de gases de efecto invernadero, se recomienda tomar las medidas necesarias para reducir los impactos a escala regional y global.

Los bosques son los ecosistemas terrestres más diversos y cumplen funciones ambientales y ecológicas, sociales y económicas. Los mismos ofrecen beneficios directos e indirectos al entorno, uno de los principales es el servicio de regulación que garantiza la provisión de agua y el equilibrio de la temperatura. Los servicios ecosistémicos de regulación del clima, de la calidad del agua y la calidad del aire son otros valiosos aportes para la sociedad. Los ecosistemas, en general, mantienen flujos de materia y energía entre sí y con otros ecosistemas; tales flujos afectan directamente la temperatura y las precipitaciones, y en la medida en que existe mayor

evapotranspiración aumenta la precipitación a escala local. Igualmente, los ecosistemas y los agroecosistemas son sumideros de CO₂, un gas de efecto invernadero que en altas concentraciones afecta la temperatura (Corredor *et al.* 2012).

Los bosques de galería o ribera, también conocidos como sotos, poseen una vegetación tan frondosa que cubre por entero un río, su nombre proviene del hecho de que su vegetación cubre al río con una especie de túnel, como en la galería de una mina. Estos bosques son formaciones de árboles, arbustos y especies herbáceas que se desarrollan en los márgenes de los ríos, extendiéndose a los riachuelos que los alimentan e inclusive a algunas zonas de drenajes de las aguas de escurrimiento, en redes continuas de vegetación natural de gran importancia ecológica, ya que controlan la erosión de los márgenes, juegan un importante rol en el ciclo del agua y la regulación ambiental, pero también se comportan como corredores de biodiversidad, que

comunican a diferentes ecosistemas (Stevenson y Rodríguez 2008).

Cuellar y Salazar (2016) sostienen que la capacidad de capturar carbono en el suelo a una profundidad de 50 cm, en los sistemas evaluados está en función de: textura y estructura, pH, nutrientes presentes, tipo de agregado, precipitación que interviene en el crecimiento de la vegetación arbórea y en la descomposición de la hojarasca, temperatura y profundidad del suelo.

De acuerdo con la Evaluación de los Ecosistemas del Milenio, los servicios ecosistémicos (SE) se pueden definir como todos aquellos beneficios que la sociedad obtiene de los ecosistemas; un concepto cada vez más aplicado a la conservación del ambiente, el bienestar humano y la implicación de las intervenciones antropogénicas en el medio natural (MEA 2005).

Se considera que los bosques tropicales del mundo, debido a su amplia distribución, elevada diversidad y contribución a funciones clave del planeta como la regulación climática e hidrológica, proveen servicios ecosistémicos críticos (Balvanera 2012).

La regulación de la calidad del agua también proviene de ecosistemas que proveen una gran variedad de funciones hidrológicas importantes para el bienestar humano. Esas funciones se convierten en bienes y servicios ecosistémicos cuando son valoradas en términos del bienestar y el desarrollo de la sociedad. Los servicios hidrológicos incluyen la regulación de caudales para mitigar inundaciones, la recarga de acuíferos que mantienen caudales durante la época seca, la purificación del agua y el control de la erosión (Corredor *et al.* 2012).

Los servicios de regulación están relacionados con la capacidad de los ecosistemas para regular procesos ecológicos esenciales y sostener sistemas vitales a través de ciclos biogeoquímicos (Camacho Valdez y Ruiz Luna 2012).

Esta investigación apoya el desarrollo de políticas sociales y ambientales que garanticen la puesta en marcha de proyectos ecosistémicos sostenibles. De conformidad con la Ley N° 4241/10 la propuesta de estudio abarca la importancia de

los ecosistemas naturales con miras al desarrollo sustentable (INFONA, PNUD, FMAM 2019).

Al respecto, el bosque de galería del Campus de la Universidad Nacional de Asunción representa un potencial ecosistémico importante para varios pobladores de las zonas aledañas. Dicho ecosistema forestal de relevancia proporciona bienes y servicios de almacenamiento de carbono, regulación del microclima local y provisión de agua para la conservación ecológica de la sub cuenca del arroyo San Lorenzo, Paraguay.

Según lo anterior, el objetivo de esta investigación fue analizar el servicio ecosistémico de regulación relacionado con el carbono almacenado y el aprovisionamiento de agua y nutrientes del bosque de galería del Arroyo San Lorenzo, Paraguay.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización. El trabajo de investigación se llevó a cabo en el Campus de la Universidad Nacional de Asunción, ubicada en la ciudad de San Lorenzo a 11 km de Asunción, capital de la República del Paraguay, entre las coordenadas 25°20'18" Lat. Sur y 57°31'04" Lat. Oeste, a 125 m sobre el nivel del mar; en el denominado bosque de galería del Campus de la Universidad Nacional de Asunción.

El bosque de galería del Campus de la Universidad Nacional de Asunción presenta una superficie aproximada de 5,3 ha (384 m x 140 m) (Benítez 2018).

Variables estudiadas. Fueron instaladas 4 parcelas (750m²) cada una en forma aleatoria en 4 puntos más representativos del lugar de estudio, considerándose el tipo de vegetación y cobertura de suelo. Para evitar el efecto de borde, todas las parcelas se ubicaron a una distancia igual o mayor a 10 m del borde.

Las variables estudiadas fueron: la composición florística, las propiedades físicas y químicas del suelo, el carbono acumulado en el estrato arbóreo aéreo, radicular y suelo y la velocidad de infiltración media del agua.

Composición florística. El inventario de composición florística se realizó con el registro de los siguientes datos en planilla: diámetro a altura de pecho igual o mayor a 10 cm, reportes de nombre científico, familia, altura total y de fuste, estado sanitario.

Propiedades físicas y químicas del suelo. Para el muestreo de suelo se extrajeron 8 muestras (4 submuestras a una profundidad de 0 a 10 cm y 4 de 10 a 30 cm) de forma aleatoria en diferentes sectores del bosque de galería, en las mismas parcelas en donde se realizó el inventario forestal, por medio de una pala de punta. Luego se procedió a la homogenización y un secado preliminar para obtener 2 muestras compuestas por sector. Para la determinación de la densidad aparente se tomaron 4 muestras aleatorias por parcela con cilindros metálicos de 100 cm³ a una profundidad de 0 a 10 cm y de 10 a 30

cm, con un total de 32 cilindros con las muestras de suelo correspondientes.

Para la interpretación de los resultados obtenidos se compararon los valores de los nutrientes en el suelo con los parámetros tomados de referencia por el Laboratorio de Suelos y Ordenamiento Territorial de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Asunción, los mismos se exponen en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1. Interpretación del contenido de nitrógeno total en porcentaje.

Niveles de Nitrógeno	% N
Bajo	0,06-0,10
Medio	0,11-0,20
Alto	0,21-0,30
Muy Alto	0,30- >0,30

Criollo (2013).

Tabla 2. Determinación del contenido de materia orgánica y nutrientes del suelo.

Nivel	Materia orgánica	P	Ca ⁺²	Mg ⁺²	K ⁺	Al ⁺³ +H ⁺
Bajo	< 1,2	< 12	< 2,51	< 0,4	< 0,12	< 0,4
Medio	1,2 – 2,8	12 – 30	2,51 – 6,0	0,4 – 0,8	0,13 – 0,17	0,4 – 0,9
Alto	> 2,8	> 30	> 6,0	> 0,8	> 0,17	> 0,9

Fatecha (1999).

En la Tabla 3, se muestran los valores tenidos en cuenta para la determinación del pH del suelo.

Tabla 3. Determinación del pH del suelo.

pH	
< 5,5	Ácido
5,6 – 6,4	Ligeramente ácido
6,5 – 7,4	Neutro
> 7,4	Alcalino

Fatecha (1999).

Velocidad de infiltración media del suelo. Para el cálculo de la velocidad de infiltración media se realizaron 2 ensayos en diferentes sitios del bosque de galería mediante la instalación de cilindros (infiltrómetros de doble anillo). Se procedió al llenado del cilindro interior con carga hidráulica constante de 8 cm y medición de la altura del nivel cada 2, 7, 10, 17, y 32 minutos, al considerar que el descenso del agua fuera notorio entre cada medición, hasta que el descenso del nivel se presentara constante.

Se utilizó la siguiente ecuación, según Pizarro Tapia *et al.* (2008).

$$I = \frac{Dh \times 600}{T}$$

Donde

- I = Velocidad de infiltración en (mm/h)
 Dh = Diferencial de altura (mm)
 t = Tiempo (min)

Carbono acumulado en el estrato arbóreo aéreo, radicular y suelo. Para estimar el carbono acumulado en el estrato arbóreo se midieron los árboles con DAP ≥ 10 cm con forcípula, altura de fuste y total con hipsómetro de cada individuo en cada parcela. Asimismo, para la determinación del carbono en suelo se procedió a la aplicación del Método de Walkley-Black, posteriormente se utilizaron las fórmulas enunciadas en la Tabla 4.

Tabla 4. Fórmulas empleadas para la estimación de carbono.

Variables	Fórmulas	Descripción
Carbono aéreo total (tC.ha ⁻¹)	CAT= BT * 0,5	CAT = Carbono aéreo total en toneladas de carbono (tC) BT = Biomasa total en tonelada (t) Factor de conversión = 0,5 (la materia seca contiene en promedio 50% de carbono almacenado, según la (IPCC 2006)
Carbono radicular (tC.ha ⁻¹)	CR= 0,24 * (CA)	CR = Carbono radicular en tonelada por hectárea CA = Carbono aéreo en tonelada por hectárea (t.ha ⁻¹) Relación media entre biomasa bajo/sobre el suelo de 0,24 para bosque (IPCC 2006)
Carbono total (tC.ha ⁻¹)	CT= CAT + CR	CT = Carbono aéreo total en toneladas de carbono (tC) CR= Carbono radicular en tonelada de carbono (tC)
Carbono equivalente (tC.ha ⁻¹)	CO ₂ e= CT * 3,667	CO ₂ e = Dióxido de carbono extraído de la atmósfera CT= Carbono total 3,667, factor basado en la razón de las masas atómicas de carbono (12) y de oxígeno (16), utilizado por el IPCC en la guía para inventarios nacionales de gases de efecto invernadero
Área basal (m ² .ha ⁻¹)	G= $\pi \times DAP^2$ 40.000	G = Área basal (m ²) $\pi = 3,1416$ DAP = Diámetro a la altura del pecho (1,30 m) 40.000 (se utilizó este denominador para obtener el valor de área basal en m ²)
Volumen de fuste (m ³ .ha ⁻¹) (fórmula de Huber)	V= G * f(*) * h _F	V = Volumen m ³ G = Área basal (m ²) f (*) = Factor de forma de Hutchinson (0,775) y h _F = Altura de fuste (m) h _T = Altura total
Volumen total (m ³ ha ⁻¹) (fórmula de Huber)	V= G * f(*) * h _T	
Biomasa de fuste (t.ha ⁻¹) (Brown 1997)	BF= (V * Pe)/1000	BF = Biomasa de fuste (t) V = Volumen de fuste (m ³) Pe = Densidad aparente de la madera (Kg/m ³)
Biomasa total (t.ha ⁻¹) (Brown 1997)	BT= BF * FEB	BT = Biomasa total en toneladas (t) BF = Biomasa del fuste en toneladas (t) FEB = Factor de expansión de biomasa FEB = (3,42) factor que se utiliza para todas las especies de árboles
Carbono orgánico en el suelo (%) Método de Walkley-Black (Tedesco <i>et al.</i> 1995)	% CO = % MO ÷ 1,72	% CO = Carbono orgánico % MO = Materia orgánica

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Composición florística. En el bosque de galería del arroyo San Lorenzo, Paraguay, se registraron 8 familias, 12 especies y 141

individuos en una superficie de 0,3 ha, equivalente a 470 individuos.ha⁻¹. Tal como se muestra en la Tabla 5, la familia más diversa y representativa fue la Meliaceae con 3 especies, seguida por la Myrtaceae y Moraceae con 2 especies.

Tabla 5. Composición florística del bosque de galería del arroyo San Lorenzo.

Familia	Nombre científico	Nombre común
CECROPIACEAE	<i>Cecropia pachystachya</i>	Amba'y
EUPHORBIACEAE	<i>Sapium haematospermum</i>	Kurupika'y
FABACEAE	<i>Inga uraguensis</i>	Inga'i
MELIACEAE	<i>Trichilia catigua</i>	Katigua
MELIACEAE	<i>Cedrela odorata</i>	Cedro
MELIACEAE	<i>Guarea glabra</i>	Cedrillo
MYRTACEAE	<i>Psidium guajava</i> L.	Guayaba
MYRTACEAE	<i>Syzygium</i> sp.	Mbopi namichai
MORACEAE	<i>Maclura tinctoria</i>	Tatajyva
MORACEAE	<i>Ficus enormes</i>	Guapo'y
RHAMNACEAE	<i>Hovenia dulcis</i>	Hovenia
SAPOTACEAE	<i>Chrysophyllum marginatum</i>	Pykasu rembi'u

Valores similares a los registrados en el presente trabajo fueron reportados por Aguirre (2017) en su investigación acerca de la estimación de carbono almacenado en el bosque de galería del arroyo San Lorenzo registró 11 familias, 16 especies y individuos a 487 individuos.ha⁻¹.

Benítez (2018), registró mayor cantidad de individuos en su trabajo de investigación referente a la dinámica de carbono en el mismo bosque de galería donde se identificaron 11 familias, 14 especies y 620 individuos.ha⁻¹.

Especies arbóreas representativas. Como se observa en el Figura 1, las especies de mayor representatividad registrada en el bosque galería son *Sapium haematospermum* (Kurupika'y) de la familia Euphorbiaceae con 55 individuos, y *Syzygium* sp. (Mbopi namichái) de la familia Myrtaceae con 40 individuos. Estas 2 especies equivalen al 67% de los individuos arbóreos registrados. Estas 2 especies fueron reportadas como las de mayor abundancia por otros investigadores en la misma zona de estudio.

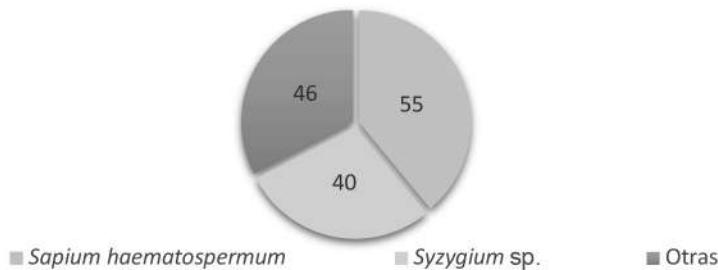


Figura 1. Especies de mayor representatividad del bosque de galería del Campus de la Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo.

Gómez (2013), en su investigación realizada en el bosque de galería del Campus de la Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, encontró 28 individuos de la especie *Sapium haematospermum* (Kurupika'y) y 21 individuos de la especie *Syzygium* sp. (Mbopi namichái). En tanto que Benítez (2018), en el mismo sitio registró 85 individuos de la especie *Syzygium* sp. (Mbopi namichái) del total de 186 árboles reclutados.

Airaldi-Wood *et al.* (2018), en una investigación realizada en este mismo sitio para la determinación de la diversidad de quirópteros en el Campus, mencionaron que las especies *Sapium haematospermum* y *Syzygium* sp., del

estrato alto del bosque se encuentran asociadas en el sitio junto con otras especies vegetales que proporcionaron a partir de sus frutos, el alimento para murciélagos frugívoros.

Volumen de fuste. El volumen de fuste de los árboles del bosque de galería en estudio fue de $48,5 \text{ m}^3 \cdot \text{ha}^{-1}$, con un rango de $29,3$ a $70,4 \text{ m}^3 \cdot \text{ha}^{-1}$ por parcela.

Como se observa en la Figura 2, existe una diferencia significativa en descenso si se tomara en cuenta las citadas investigaciones de años anteriores. El descenso, presentado se debe al bajo número de individuos. ha^{-1} encontrado con respecto a los trabajos anteriores.

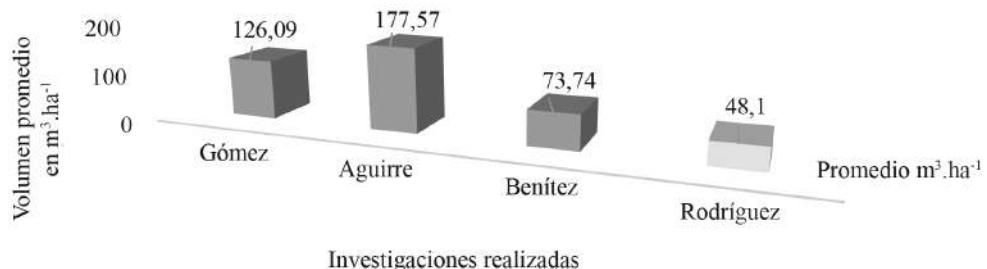


Figura 2. Volumen de fuste comparativo en el bosque de galería del arroyo San Lorenzo.

A esto se le suma la gran cantidad de individuos enfermos encontrados. Del total de 141 individuos arboreos en 0,3 hectáreas del bosque de galería del Campus, 91 estaban enfermos lo que equivale a un 64,50% y 50 se encontraban sanos lo que correspondió a 35,40%.

Propiedades físicas y químicas del suelo. El suelo del bosque de galería estudiado presentó textura arenosa, con tonos que van de marrón a marrón pálido. La densidad del suelo fue de $1287,5 \text{ kg/m}^3$ y 1375 kg/m^3 para las 2

profundidades, lo 1u3 según Fuentes Yague (1999) corresponde a suelos no compactados.

Aldana Lázaro (2017), sostuvo que el suelo de la especie *Schinus molle* contenía carbono en el rango de 0,64% a 0,72% y el suelo de la especie *Ficus benjamina* contiene carbono en un rango de 0,20% a 0,27%. Siendo el suelo de la especie *Schinus molle* la que almacenaba mayor cantidad de CO₂ con un total de 43,20 t.ha⁻¹, mientras que el suelo de la especie *Ficus benjamina* almacena 20,92 t.ha⁻¹. Esto se debe a que existen mayor cantidad de individuos forestales pertenecientes a la especie *Schinus molle* en comparación a la especie *Ficus benjamina*.

Estos valores son próximos a los reportados por Andrade-Castañeda *et al.* (2016) quienes obtuvieron una densidad aparente entre 1,1 y 1,7 g/cm³.

El nitrógeno total encontrado en el suelo fue de 0,09% y 0,06% para 0 – 10 cm y 10 – 30 cm respectivamente. La materia orgánica se encontraba en niveles bajos y medios, y el pH ácido. En cuanto a los nutrientes, el nivel de Fósforo (P) fue bajo, el contenido de Calcio (Ca²⁺) fue medio, el contenido de Magnesio (Mg²⁺) y Potasio (K⁺) fue alto, y por último el porcentaje de aluminio (Al³⁺+H⁺) fue bajo Tabla 6.

Tabla 6. Propiedades químicas del suelo del bosque de galería.

Profundidad (cm)	PH	P (mg.kg ⁻¹)	Ca ²⁺ (mg.kg ⁻¹)	Mg ²⁺ (mg.kg ⁻¹)	K ⁺ cmol _c .kg ⁻¹	Al ³⁺ +H ⁺ (mg.kg ⁻¹)
0 – 10	5,28	2,18	3,08	1,14	0,34	0,21
10 – 30	5,38	2,18	3,03	1,33	0,40	0,22

Los datos coincidieron con lo mencionado por Aguirre (2017), quien en su investigación señaló que el suelo corresponde a la clase textural arenosa con tonalidad marrón, amarillo pálido a marrón negruzco entre otras. En cuanto al Nitrógeno (N) el porcentaje ha disminuido si se compara con los resultados obtenidos por Aguirre, quien obtuvo valores de 0,15% y 0,09% respectivamente.

Según Jandl *et al.* (2004), la fuente principal del Nitrógeno (N) en los suelos la constituye la mineralización de la materia orgánica. Según los resultados obtenidos a

mayor profundidad disminuye la MO, y por tanto repercute en la relación Carbono/Nitrógeno (C/N).

Velocidad de infiltración media en el suelo. En el primer ensayo se obtuvo un promedio de 102 mm.h⁻¹. El segundo ensayo se realizó a una distancia de 100 metros del primer ensayo, terreno abajo cercano al cauce, con un resultado de 30 mm.h⁻¹. Se estima que la velocidad de infiltración media en el suelo del bosque de galería fue de 66 mm.h⁻¹ según esos 2 resultados Figura 3.

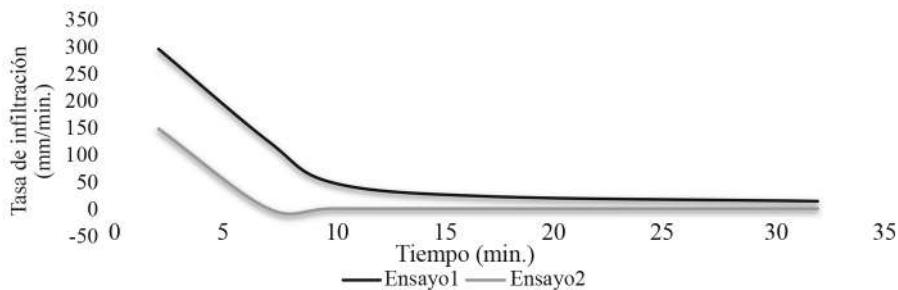


Figura 3. Curvas de infiltración medio en el suelo del bosque de galería.

Los macroporos del suelo están colmados de agua sin posibilidad de circulación del aire. La casi nula presencia de oxígeno (O_2) en los poros de los horizontes superficiales, permite las condiciones anaeróbicas donde existe una descomposición muy lenta de la materia orgánica. Esta condición afecta la disponibilidad de los nutrientes para las plantas y su desarrollo.

Thiers *et al.* (2014), se refirieron a esta condición de saturación al citar que el agua compite con el aire del suelo para ocupar el espacio poroso y, por lo tanto, controla la convección de gas y difusión a través del suelo, que afecta la actividad de los organismos y el potencial de oxidación/reducción en el suelo.

Van Lier (2017), afirmó que el valor de la conductividad hidráulica saturada, a su vez está determinada en gran medida por la presencia de macroporos y su continuidad. Por lo tanto, una pérdida de macroporosidad, como ocurre en la degradación del suelo por compactación, resulta en una conductividad hidráulica reducida saturada y por lo tanto con un aumento en el contenido de agua a capacidad de campo.

Carbono acumulado y CO_2 equivalente en el bosque de galería. El carbono almacenado en el estrato arbóreo fue de $38,4 \text{ tC.ha}^{-1}$, el error de muestreo $\pm 1,64 \text{ tC.ha}^{-1}$ con un nivel de confianza de 95%, el valor promedio de carbono acumulado en el suelo fue de $31,08 \text{ tC.ha}^{-1}$, que totaliza $69,48 \text{ tC.ha}^{-1}$ de carbono acumulado en los 2 componentes del ecosistema en estudio.

Los resultados de Andrade-Castañeda *et al.* (2016) mencionan que el carbono almacenado en los bosques riparios de su área de estudio fue de entre $50,2$ a $87,1 \text{ tC.ha}^{-1}$, resultados muy altos en comparación con lo reportado por Batjes (1999) con los datos de FAO-IIASA en zonas agroecológicas y climáticas similares del trópico (36 a 38 tC.ha^{-1}).

El contenido de carbono del mismo bosque según Benítez (2018), fue de $126,9 \text{ tC.ha}^{-1}$. En la presente investigación se obtuvo un total de $69,48 \text{ tC.ha}^{-1}$ lo que expone una diferencia de $57,41 \text{ tC.ha}^{-1}$. Al considerar esa variación, se demuestra que hubo un descenso en la cantidad de carbono acumulado en el periodo (2018-2020) que podría atribuirse a la mortandad de árboles en la zona de estudios, al respecto, Lugo y Scatena (1996) sugieren que en la mayoría de los árboles de clases diamétricas y alturas superiores ocurre una senescencia producida por factores endógenos como la genética y la edad.

Así también Carey *et al.* (1994) afirman que los árboles mueren de pie producto de debilitamiento a causa de enfermedades o estrés ambiental, y en su caída llevan a otros individuos de clases diamétricas menores.

El dióxido de carbono equivalente extraído de la atmósfera arrojó un promedio de $254,81 \text{ tCO}_2\text{e.ha}^{-1}$, valor que ha disminuido según las investigaciones anteriores, y que también fue atribuible a la muerte de individuos arbóreos, tal como se puede ver en la Figura 4.

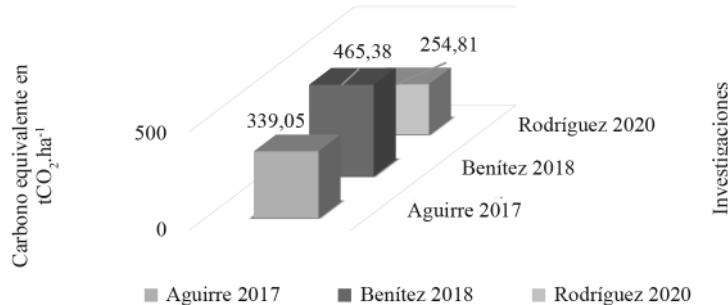


Figura 4. Comparación de carbono equivalente del bosque de galería del Arroyo de San Lorenzo.

Estos valores son superiores a los reportados por Suarez García (2017) quien determinó el almacenamiento de biomasa 9,46 t.ha⁻¹ y carbono 4,73 t.ha⁻¹ CO₂, así como el potencial de captura de 30,10 t.ha⁻¹ CO₂.

Resultados similares fueron reportados por González Pantoja (2019) en donde el Cerro Nutibara almacenó 34 tC.ha⁻¹ y 126 tC.ha⁻¹ mientras que el Cerro Volador 6 tC.año⁻¹ y 20 126 t CO₂ e.

Los resultados de la presente investigación coincidieron con las afirmaciones de Torres (2017), quien indicó que el carbono almacenado en la biomasa aérea fue mayor que la del suelo.

CONCLUSIONES

El bosque de galería ofrece servicios ecosistémicos de regulación como captación de carbono, constituyen la biomasa arbórea el mayor reservorio de carbono pese a la mortandad muchos individuos arbóreos lo que provoca la reducción en su capacidad de almacenamiento de carbono, aunque representan un gran potencial para la captura de CO₂. Son una fuente de aprovisionamiento de agua para la conservación, además de constituirse como fuente de nutrientes del suelo que a excepción del fósforo, se mantuvieron en niveles medios y altos, en la sub cuenca del arroyo San Lorenzo, Paraguay.

LITERATURA CITADA

- Aguirre, P. 2017. Estimación de carbono almacenado en el bosque de galería del campus de la Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo. Tesis Ing. Amb. San Lorenzo, Paraguay, Universidad Nacional de Asunción. 70 p.
- Airaldi-Wood, K; Torres, M; Barreto, M; Weiler, A; González de Weston, G; Zárate, G; Stevens, R. 2018. Quirópteros del campus de la Universidad Nacional de Asunción-Paraguay. Bol Mus Nac Hist Nat Parag 22(1):45-46.
- Aldana Lázaro, R. 2017. Equilibrio entre el CO₂ del ambiente y CO₂ capturado por biomasa de especies forestales ornamentales y en el suelo en la Av. Trapiche, Comas 2017. Tesis Ing. Amb. Lima, Perú, Universidad César Vallejo. 106 p.
- Andrade-Castañeda, HJ; Segura-Madrigal, MA; Rojas-Patiño, AS. 2016. Carbono orgánico del suelo en bosques riparios, arrozales y pasturas en Piedras, Tolima, Colombia. Agronomía Mesoamericana 27(2):233-241.
- Balvanera, P. 2012. Los servicios ecosistémicos que ofrecen los bosques tropicales. Ecosistemas 21(1-2):136-147.
- Batjes, NH. 1999. Management options for reducing CO₂ concentrations in the atmosphere by increasing carbon sequestration in the soil. Wageningen, The Netherlands, International Soil Reference and Information Centre (ISRIC). 114 p.
- Benítez, I. 2018. Dinámica del contenido de carbono en el bosque de galería del campus de la Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo. Tesis Ing. For. San Lorenzo, Paraguay, Universidad Nacional de Asunción. 80 p.
- Brown, S. 1997. Estimating biomass and biomass change of tropical forests: a primer: FAO forestry paper – 134 (en línea). Roma. Consultado 20 mar. 2016. Disponible en www.fao.org/docrep/W4095E/w4095e00.htm

- Camacho Valdez, V; Ruiz Luna, A. 2012. Marco conceptual y clasificación de los servicios ecosistémicos. *Bio Ciencias* 1:3-15.
- Carey, E; Brown, S; Gillespie, AJR; Lugo, A. 1994. Tree Mortality in Mature Lowland Tropical Moist and Tropical Lower Montane Moist Forests of Venezuela. *Biotropica* 26(3):255-265.
- Corredor, E; Fonseca, J; Páez, E. 2012. Los servicios ecosistémicos de regulación: tendencias e impactos en el bienestar humano (en línea). Colombia, UNAD. p. 78. Consultado 20 oct. 2019. Disponible en <https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/riaa/article/view/936/934>
- Criollo, N. 2013. Evaluación de alternativas silvopastoriles que promuevan la intensificación y recuperación de pasturas degradadas y contribuyan a reducir el impacto ambiental de la actividad ganadera en la amazonía ecuatoriana al segundo año de establecimiento (en línea). Consultado: 3 oct 2016. Disponible en <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/2819>
- Cuellar, J. Salazar, E. 2016. Dinámica del carbono almacenado en los diferentes sistemas de uso de la tierra en el Perú. Lima, Perú, Instituto Nacional de Innovación Agraria INIA. 217 p.
- Fatecha, A. 1999. Guía para la fertilización de cultivos agrícolas en la Región Oriental del Paraguay. Boletín Técnico. Caacupé, Paraguay, IAN. s.p.
- Fuentes Yague, JL. 1999. El suelo y los fertilizantes. 5 ed rev. y ampl. Madrid, España, Ediciones Mundiprensa. 352 p.
- Gómez, H. 2013. Estimación del almacenamiento de carbono en el estrato arbóreo del bosque de galería en el campus de San Lorenzo de la Universidad Nacional de Asunción. Tesis Ing. For. San Lorenzo, Paraguay, Universidad Nacional de Asunción. 45 p.
- González Pantoja, A. 2019. Evaluación de la remoción de contaminantes atmosféricos y la captura de carbono por parte de los Cerros Nutibara y Volador de Medellín. Tesis Ing. Amb. Evgado, Colombia, Universidad EIA. 128 p.
- INFONA (Instituto Forestal Nacional, Paraguay); PNUD (Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo, Paraguay); FMAM (Fondo para el Medio Ambiente Mundial, Paraguay). 2019. Manual técnico para la administración y aplicación de la Ley N° 4241/10 “De restablecimiento de bosques protectores de cauces hídricos dentro del territorio nacional” y su Decreto N° 9824/12. Asunción, Paraguay. 76 p.
- IPCC (Panel Intergubernamental sobre Cambio Climático, Japón). 2006. Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories. In Eggelston, S; Buendia, L; Miwa, K; Ngara T; Tanabe, K (eds.). Prepared by the National Greenhouse Gas Inventories Programme (en línea) Kanagawa, Japón, IGES. Consultado el 05 set. 2020. Disponible en <https://www.ipcc-nggip.iges.or.jp/>
- Jandl, R; Rubio, A; Blanco, A. 2004. Cambios en la química de los suelos forestales de Centroeuropa: acidificación y eutrofización (en línea). *Ecología* 18:285-295. Consultado 30 set. 2020. Disponible en <https://core.ac.uk/download/pdf/148691614.pdf>
- Lugo, A; Scatena, F. 1996. Background and Catastrophic Tree Mortality in Tropical Moist, Wet, and Rain Forests. *Biotropica* 28(4):585-599. DOI: <https://doi.org/10.2307/2389099>.
- MEA (Evaluación de Ecosistemas Del Milenio, Estados Unidos de América). 2005. Ecosystems and human wellbeing: synthesis (en línea). Washington, Estados Unidos de América, Island Press. Consultado 13 oct. 2019. Disponible en www.millenniumassessment.org/
- Pizarro Tapia, R; Flores Villanelo, JP; Sangüesa Pool, C; Martínez Araya, E; León Gutiérrez, L. 2008. Diseño hidrológico de zanjas de infiltración en el secano costero e interior de las regiones semiáridas de Chile. *Bosque* (Valdivia) 29(2):136-145.
- Stevenson, P; Rodríguez, M. 2008. Determinantes de la Composición Florística y efecto de borde en un Fragmento de Bosque en el Guaviare, Amazonia Colombiana. 17 p.
- Suarez García, P. 2017. Evaluación ecológica de la estructura vertical y valoración económica por prestación del servicio de captura de carbono del bosque de galería asociado del Río Hualahuises (Nuevo León, México). Tesis Ing. Bogotá, Colombia, Universidad Distrital Francisco José de Caldas. 51 p.
- Tedesco, MJ; Gianello, C; Bissani, CA; Bohnen, H; Volkweiss, SJ. 1995. Análise de solo, plantas e outros materiais. 2 ed. Porto Alegre, UFRGS. 174 p.
- Thiers, O; Reyes, J; Gerding, V; Schlatter, JE. 2014. Suelos en ecosistemas forestales. In Donoso, C; González, M; Lara, A (eds.). *Ecología Forestal: bases para el manejo sustentable y conservación de los bosques nativos en Chile*. Valdivia, Chile, UACH. p. 133-178.
- Torres, EM. 2017. Determinación de cantidades de carbono secuestrado por las áreas verdes del Distrito de Calleriá, Provincia de Coronel Portillo, 2015. Tesis M.Sc. Ucayali, Perú, Universidad Nacional de Ucayali. 156 p.
- Van Lier, Q. 2017. Como as alterações no solo e no clima afetam a disponibilidade de água para as plantas? Congreso Paraguayo de Ciencia del Suelo. In Leguizamón, C; González, A; Paniagua, J; Hahn, E (eds.). Simposio de Manejo y Conservación de Suelos. San Lorenzo, Paraguay, Suindá. 252 p.



Todos los derechos reservados. Universidad de Costa Rica. Este artículo se encuentra licenciado con Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Costa Rica. Para mayor información escribir a rac.cia@ucr.ac.cr

NORMAS DE PUBLICACIÓN

La Revista Agronomía Costarricense es una publicación semestral editada y financiada por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica, funciona con el respaldo de profesionales de la Universidad de Costa Rica, el Colegio de Ingenieros Agrónomos y el Ministerio de Agricultura y Ganadería que conforman su Consejo Editorial.

OBJETIVO DE LA REVISTA

El objetivo de la Revista Agronomía Costarricense desde su creación en 1977 ha sido publicar, visibilizar y facilitar el acceso de la investigación agropecuaria y forestal con temas de interés y actualidad científica del sector.

TIPO DE PUBLICACIÓN

- Trabajos originales e inéditos de investigación, que tengan mérito científico o técnico a juicio del Consejo Editorial.
- Artículos.
- Notas técnicas, que son avances o resultados paralelos de investigaciones en marcha.
- Análisis y comentarios sobre temas relevantes, solicitados a especialistas.
- Revisiones de literatura exhaustivas sobre un tema específico.
- Reseñas de libros.

NORMAS PARA PUBLICACIÓN

Los trabajos publicados en la Revista Agronomía Costarricense son el resultado de una selección rigurosa, por parte del Consejo Editorial en primera instancia y el arbitraje realizado por especialistas nacionales e internacionales, mediante el sistema de revisión por pares doble ciego.

Una vez que el Consejo Editorial evalúa previamente el mérito científico o técnico de los trabajos, son remitidos con el instrumento de evaluación, a especialistas nacionales e internacionales. El dictamen puede emitir los siguientes criterios:

- El documento se acepta sin reservas.
- Se acepta sólo si se incluyen las observaciones.
- No se acepta del todo para publicación.

En caso de que se presente controversia entre las evaluaciones realizadas para un mismo documento, se somete a otra revisión por parte de nuevas personas especialistas cuya valoración determine el resultado definitivo para publicar o no.

Si el documento es aceptado clasifica en una de las siguientes categorías:

- Artículo.
- Nota técnica.
- Otros: Análisis y comentario, revisión de literatura, reseñas de libros.

La persona editora en conjunto con quienes conforman el Consejo Editorial de la Revista Agronomía Costarricense, determinan si se acepta o rechaza la documentación presentada para posible publicación.

Los trabajos pueden ser escritos en español o inglés. Deben ajustarse a las normas de redacción establecidas para la estructura del manuscrito. Es recomendable que los manuscritos en inglés sean revisados y corregidos previamente por una persona especialista del tema cuya lengua materna sea el inglés. (El aporte del material recibido no será devuelto a las personas autoras).

- Los trabajos de investigación no deben ser mayores de 20 páginas y las notas técnicas no deben exceder las 6 páginas.
- La Revista Agronomía Costarricense no cobra por recibir manuscritos o por publicar investigaciones.
- El trabajo debe estar escrito en una versión actualizada de Word para Windows, a doble espacio y con tipo de letra arial 12.
- Las personas autoras deben seguir las normas del Sistema Internacional de Unidades tanto en el texto como en las tablas que suministren.
- El manuscrito debe ser enviado al correo electrónico de la Revista Agronomía Costarricense.
- Las tablas deben ser presentadas en Word y en Excel las figuras y gráficos en diferentes tonos de grises, en orden ascendente por números y letras según corresponda. Tanto las tablas como las figuras se deben presentar en páginas independientes impresas en buena calidad. Otras figuras y fotografías se deben presentar en formato eps, jpg o tiff con un mínimo de 240-300 dpi.

Los trabajos deben ser enviados o entregados personalmente, en nuestra dirección:

REVISTA AGRONOMÍA COSTARRICENSE

Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica
San José, Costa Rica.
Teléfono 2511 2080, fax 2234 1627
Correo electrónico: rac.cia@ucr.ac.cr

ESTRUCTURA DEL MANUSCRITO

Título. Debe ser lo suficientemente claro de forma tal que oriente al lector sobre el contenido de la investigación y que no exceda de 15 palabras.

Autor (a). Escribir el nombre completo, con ambos apellidos separados por un guión como se muestra a continuación: Serrano-Velázquez. La instrucción aplica también para las personas coautoras. Deberán agregar al pie de página la afiliación institucional indicada con un número para cada una de las personas participantes en la investigación y sólo el correo electrónico institucional de la persona que el equipo investigador seleccione para correspondencia.

El documento presentado será evaluado dentro de la modalidad de artículo de investigación, nota técnica, revisiones de literatura sobre un tema específico, reseñas de libros y actualizaciones o análisis y comentarios sobre actividades agropecuarias específicas. La decisión final sobre la modalidad para publicación del manuscrito será con base en el criterio de las personas revisoras y recomendaciones de quienes integran el Consejo Editorial y Consejo Editorial Asesor Internacional.

Código ORCID. Sirve para identificar a la persona autora con un código único que le diferenciará de cualquier otra persona que publique. Dicho código es requerido para afiliar tanto a la persona que investiga como a las publicaciones que realice. Deberá registrar nombre completo, correo electrónico y una contraseña en el siguiente enlace: <http://orcid.org/>

El enlace señalado anteriormente generará automáticamente el código ORCID de la persona que publica. En el caso de que en una publicación participen varios (as) autores (as) deberá aparecer el ORCID de cada una de las personas participantes en la publicación y no sólo la de la persona señalada como contacto para correspondencia. Ese código aparecerá al pie de la página para cada una de las personas participantes en la publicación.

Resumen estructurado. Este es un párrafo donde se debe señalar, en un máximo de 300 palabras, la introducción, el objetivo del trabajo, los materiales y métodos, los principales resultados y las conclusiones. Tratar de incluir cifras. Los términos “Introducción, Objetivo, Materiales y métodos, Resultados y Conclusión” deben ser destacados en negrita para diferenciar esos contenidos dentro del resumen.

Abstract. Debe ser exacto al resumen en español y debe incluir el título en inglés.

Palabras clave. Incluir hasta 5 palabras clave que le permitan a un usuario localizar en una plataforma digital la publicación.

Introducción. Debe incluir la justificación del trabajo, los antecedentes más relevantes sobre el tema y el objetivo concreto del trabajo.

Materiales y métodos. Se refiere a todos los materiales y métodos requeridos para el desarrollo de la investigación, con una detallada descripción de los mismos que le permitiera alcanzar resultados específicos del tema tratado. Si la persona autora requiere algún programa especializado debe presentar una descripción y conveniencia de su utilización para alcanzar los resultados.

Resultados y discusión (pueden venir juntos o separados). Su contenido se fundamenta en los resultados obtenidos a partir del objetivo planteado en la investigación. Independientemente de su complejidad, requieren ser expuestos de forma clara y sencilla. Los resultados pueden ser números, categorías o agrupaciones de los objetos o sujetos de estudio. La exposición de los resultados debe caracterizarse por la precisión y legitimidad de los hechos y cifras registradas, por lo que no se admiten resultados que se apoyen únicamente en calificativos como por ejemplo: mucho, poco, más, menos, bastante, pues podría conducir a una interpretación inexacta que debilita la investigación.

Agradecimientos. En esta sección sólo se incluye aquellas personas que hicieron un aporte muy significativo al trabajo.

Literatura citada. Debe redactar las referencias de acuerdo con el Manual “**Redacción de referencias bibliográficas: normas técnicas para ciencias agroalimentarias del IICA-CATIE**”. Disponible en <http://www.iica.int/sites/default/files/publications/files/2016/b4013e.pdf>

Ejemplos:

Revista

Saborío, A; Sánchez, J. 2014. Evaluación de la condición corporal en un hato de vacas Jersey en pastoreo en la zona alta de Cartago. Variaciones durante el ciclo productivo. *Agronomía Costarricense* 38(1):55-65.

Libro

Garita, RA. 2014. La piña. Cartago, Costa Rica, Editorial Tecnológica de Costa Rica. 568 p.

Capítulo de un libro

Molina, E; Alvarado, A. 2012. Manejo de la acidez y encalado de suelo. In Alvarado, A; Raigosa, J (eds.). Nutrición y fertilización forestal en regiones tropicales. San José, Costa Rica, ACCS. p. 159-177.

Tesis

Reyes, D. 2012. Compuestos GRAS para el control de patógenos poscosecha in vitro en mango (*Mangifera indica* L.), piña (*Ananas comosus* L.) y papaya (*Carica papaya* L.), y pruebas de eficacia in vivo en piña. Tesis Lic. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 92 p.

Referencias en Internet

Autor, año. Título del trabajo (en línea). Ciudad, país. Fecha de consulta y vínculo. Se debe verificar el tipo de publicación según corresponda libro, revista, etc., para redactar la cita.

DERECHOS DE AUTOR

El autor, la autora o los autores deben autorizar por escrito a la Revista Agronomía Costarricense el derecho de su primera publicación y mención que quedará registrada con la licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Costa Rica y conserva todos sus derechos y además, podrán incluir su publicación en un repositorio institucional que especifique su publicación en primera instancia, en la Revista Agronomía Costarricense.

Una vez publicado el volumen del periodo respectivo, se puede acceder a la versión digital, lo que permite gestionar un autoarchivo del documento o documentos de interés, en el sitio seleccionado por la persona autora.

El autor o la autora principal, debe dar fe por escrito, que la información presentada es original y no ha sido publicada en ningún otro medio. Además, desde el momento que entrega la documentación, debe contar con la autorización escrita de la institución donde se realizó la investigación.

POLÍTICA DE DETECCIÓN DE PLAGIO

Mediante herramientas de Google y DupliChecker, la Revista Agronomía Costarricense es vigilante de las fuentes que se utilizan en la dinámica de investigación para determinar el uso de ideas originales sin la citación de la fuente o bien por la utilización de palabras de otros sin citarlos en el documento y en la lista de referencias bibliográficas.

De igual manera se incurre en plagio cuando se falsifican las palabras de otros para asumirlas como propias o bien cuando indica ser el autor o autora de una investigación cuando su propietario es otra persona. De ser detectado un plagio, se indicará por escrito al autor principal como se procederá.

POLÍTICA DE ACCESO ABIERTO

Esta revista provee acceso libre inmediato a su contenido bajo el principio de hacer disponible gratuitamente la investigación al público, con el propósito de fomentar un mayor intercambio de conocimiento global.

ARCHIVO

La revista cuenta con la preservación de sus archivos digitales, primeramente, los archivos se encuentran integrados en la base de datos del Ministerio de Agricultura y Ganadería, la cual cuenta con un sistemas de respaldo, cuyas Políticas y Normas se pueden encontrar en el enlace: <http://www.mag.go.cr/sg%20mag/Nomas%20y%20Politicas%20Generales%20de%20TI-2016.pdf>

Asimismo, se cuenta con el respaldo digital del repositorio Kérwá de la Universidad de Costa Rica, y el sistema de administración y publicación de revistas OJS. Además, semestralmente la revista envía un CD, con el volumen respectivo, al Sistema Nacional de Bibliotecas (SINABI); por lo que ahí se encuentra un respaldo de los manuscritos.

La revista también utiliza el sistema CLOCKSS para crear un archivo distribuido entre las bibliotecas participantes, lo que permite a dichas bibliotecas, crear archivos permanentes de la revista con fines de preservación y restauración. Se puede encontrar más información en el siguiente enlace: <http://thekeepers.org/>

CÓDIGO DE ÉTICA

DEBERES DEL O LA EDITORA

El o la editora, debe vigilar por publicaciones originales con mérito científico o técnico, con apoyo del Consejo Editorial. De esta manera, puede aceptar o rechazar un trabajo bajo los criterios expuestos en las normas de publicación de la revista y su contenido intelectual sin distinción de género, orientación sexual, ideología política o religiosa, nacionalidad u origen étnico de las personas. Los textos recibidos serán remitidos a especialistas nacionales e internacionales para su revisión por pares doble ciego. En todo el proceso, el editor o editora debe garantizar la confidencialidad a las partes, así que no puede revelar información acerca del contenido del manuscrito, tampoco los nombres de las personas que solicitan publicar o los nombres de quienes realizan la revisión y evaluación del documento.

DEBERES DE LAS PERSONAS QUE CONFORMAN EL CONSEJO EDITORIAL

A quienes conforman el Consejo Editorial, les corresponde contribuir con la asignación de personas revisoras nacionales e internacionales según la temática del documento recibido; también deben auxiliar en la revisión preliminar de manuscritos sobre materias afines a su profesión y apoyar con la actualización, mejora y evaluación periódica de la revista.

DEBERES DE LAS PERSONAS AUTORAS

Deben seguir los criterios expuestos en las normas de publicación de la Revista Agronomía Costarricense. Asimismo, deben documentar por escrito, que la información presentada es original,

que no ha sido publicada o considerada para su publicación en otro medio; además, debe incluir dentro de la documentación que presente, la autorización escrita de la institución donde se generó el documento. Quienes publiquen deben saber que la utilización de datos, información de otras personas autoras sin citarlas en el documento y en la lista de referencias bibliográficas, así como la adopción de ideas para asumirlas como propias, se podría presumir como plagio y de comprobarse, su texto no se tomaría en cuenta para la publicación. De esta forma deben citar completa y adecuadamente las fuentes bibliográficas de los textos que aportan en el trabajo presentado. Para la autoría, es preciso que se nombren como personas co-autoras, quienes contribuyan significativamente en el desarrollo del estudio. Deben citar en el texto todas las fuentes financieras en las que se apoyaron, al igual que cualquier conflicto económico o de intereses que podría influenciar en los resultados finales del manuscrito.

En los documentos presentados no deben aparecer los nombres de productos o casas comerciales (®), pues compromete su publicación. Por último, si quien publica identificara algún error en su artículo, deberá informarlo 15 días posteriores a la entrega del último documento que presentó para su publicación al correo rac.cia@ucr.ac.cr

DEBERES DE LAS PERSONAS REVISORAS

A toda persona especialista le compete notificar al editor o editora, cuando se le consulte, si le es posible revisar el documento que se le solicita evaluar. De aceptar deberá realizar su trabajo de manera objetiva, sus críticas han de tener argumentos sustentados en la ciencia y no ha de tener ningún conflicto de intereses con la información presentada o la autoría, aspectos que deberá indicar antes de aceptar y llevar a cabo la evaluación del documento.

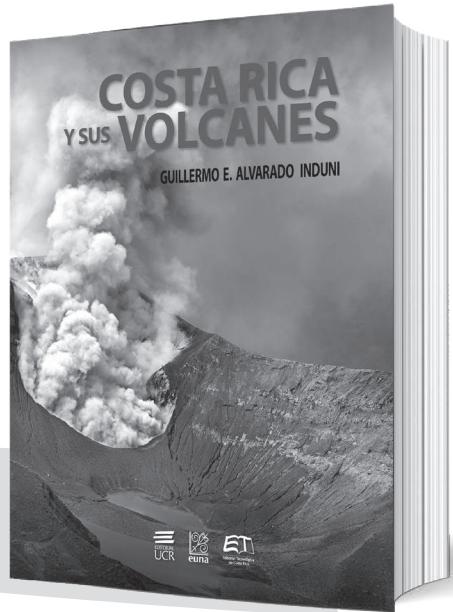
Quienes contribuyen en la revisión de los documentos presentados para posible publicación han de comunicar al editor o editora, acerca de cualquier comportamiento no ético identificado en el manuscrito revisado, además de los aportes de información crítica y constructiva para el mejoramiento del texto, o bien, para el rechazo del mismo. De igual forma, conocen que el material que se les entrega para su evaluación debe ser tratado con absoluta confidencialidad, por lo cual no podrán revelar a terceras personas ningún dato o utilizar la información del documento para proyectos personales.

EDITORIAL UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

Costa Rica y sus volcanes

Guillermo Alvarado Induni

1.a ed. 2021
21,83 cm x 28,42 cm
976 pp.
ISBN 978-9968-46-776-6



Se presenta un cuadro sinóptico y actualizado sobre los volcanes de Costa Rica, su formación y actividad eruptiva, historia, influencia socioeconómica y cultural, hasta llegar a un grado de conocimiento y desarrollo vulcanológico, que posiciona a Costa Rica a nivel internacional.



LIBRERÍA — UCR
Tels.: 2511 5858 • 2511 5859

Portal DE LA Investigación

Ciencia universitaria a su alcance



Información

- Noticias de ciencia y tecnología
- Proyectos de investigación
- Agenda de investigación
- Nuevas publicaciones

Opinión

- Vox populi
- Opinión
- Foro

Plataforma de medios

- Programa En la Academia
- Serie televisiva Girasol
- Revista Girasol digital
- Cápsula Girasol



www.vinv.ucr.ac.cr



Estimados suscriptores:

Las revistas académicas de la Universidad de Costa Rica difunden los más recientes avances en artes, filosofía, ciencias y tecnología. Nuestras revistas se caracterizan por su alta calidad y precios accesibles. Mejorar continuamente es nuestra tarea. Para nosotros es muy importante el apoyo de nuestros lectores.

Le invitamos a renovar su suscripción.

El pago para suscriptores nacionales se puede realizar mediante depósito bancario o transferencia electrónica de fondos en la Cuenta Maestra 100-01-080-000980-6 de la Universidad de Costa Rica (UCR) con el Banco Nacional y enviarnos copia del comprobante por fax al N° (506) 2511-5417 o al correo electrónico distribucionyventas.siedin@ucr.ac.cr. También puede cancelar en la Sección de Comercialización, ubicada frente a la Facultad de Artes.

Para el pago de suscripciones internacionales, por favor contacte su agencia suscriptora o escríbanos al correo electrónico distribucionyventas.siedin@ucr.ac.cr

Horario de atención de 7:00 a. m. a 11:45 a. m. y de 1:00 p. m. a 3:45 p. m.

SUSCRIPCIÓN DE REVISTAS • JOURNAL SUBSCRIPTION FORM

Nombre / Name: _____

Dirección / Address: _____

Apartado / P.O. Box: _____ Teléfono / Telephone: _____ E-mail: _____

Suscripción anual / Annual subscription

- | | |
|---|-------------|
| <input type="checkbox"/> AGRONOMÍA COSTARRICENSE | ₡ 8160.00 |
| <input type="checkbox"/> ANUARIO DE ESTUDIOS CENTROAMERICANOS | ₡ 4 080.00 |
| <input type="checkbox"/> BIÓLOGÍA TROPICAL | ₡ 12 240.00 |
| <input type="checkbox"/> CIENCIAS ECONÓMICAS | ₡ 8 160.00 |

Suscripción anual / Annual subscription

- | | |
|--|-------------|
| <input type="checkbox"/> CIENCIAS SOCIALES | ₡ 12 240.00 |
| <input type="checkbox"/> DIÁLOGOS | ₡ 8 160.00 |
| <input type="checkbox"/> FILOLOGÍA Y LINGÜÍSTICA | ₡ 8 160.00 |
| <input type="checkbox"/> FILOSOFÍA | ₡ 12 240.00 |

Suscripción anual / Annual subscription

- | | |
|--|------------|
| <input type="checkbox"/> LENGUAS MODERNAS | ₡ 8 160.00 |
| <input type="checkbox"/> MATEMÁTICA: TEORÍA Y APLICACIONES | ₡ 8 160.00 |

Los precios incluyen el 2% de Impuesto al Valor Agregado

Precios internacionales / International prices

América Latina, Asia y África

US\$ 20.40

Resto del mundo
Excepto Biología Tropical y Ciencias Sociales
Filosofía

US\$ 71.40
US\$ 102.00
US\$ 91.80

FAVOR HACER SU PAGO A NOMBRE DE: • PLEASE MAKE CHECK PAYABLE:
UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

Los precios incluyen el 2% de Impuesto al Valor Agregado

www.editorial.ucr.ac.cr

Esta revista se terminó de imprimir en la
Sección de Impresión del SIEDIN, en junio 2022.

Universidad de Costa Rica
Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

AGRONOMÍA COSTARRICENSE

REVISTA EN LÍNEA

Si desea visitar la Revista Agronomía Costarricense puede hacerlo a través de:

Ministerio de Agricultura y Ganadería http://www.mag.go.cr/rev_agr/index.html

Portal de Revistas Académicas de la Universidad de Costa Rica <http://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agrocost>

Centro de Investigaciones Agronómicas www.cia.ucr.ac.cr

CORRESPONDENCIA Y SUSCRIPCIONES

Editorial Universidad de Costa Rica
administracion.siedin@ucr.ac.cr
www.editorial.ucr.ac.cr
Apartado Postal 11501
2060 Ciudad Universitaria Rodrigo Facio
Costa Rica

Número suelto:

Costa Rica ₡ 3060.00 incluye el 2% de IVA

Suscripción anual:

Costa Rica	₡ 8160.00
América Latina,	
Asia y África	US\$ 20.40
Resto del mundo	US\$ 71.40

CANJES

Universidad de Costa Rica
Sistema de Bibliotecas, Documentación e Información
Unidad de Selección y Adquisiciones
-CANJE
Ciudad Universitaria Rodrigo Facio
Costa Rica

DIRECCIÓN

REVISTA AGRONOMÍA COSTARRICENSE

Centro de Investigaciones Agronómicas
Universidad de Costa Rica
San José, Costa Rica
Teléfono 2511-2080
Fax 2234-1627
Correo electrónico: rac.cia@ucr.ac.cr

Contents

Scientific papers

Morphogenic characterization of vanilla (<i>Vanilla planifolia</i> Andrews) for propagation. <i>Juan Villegas-Ramírez and Tomás Palma-Zúñiga</i>	9-24
Foliar nutrient diagnosis of nine tropical forestry species from three altitudinal belts of Central America. <i>Alfredo Alvarado-Hernández, Ronald Chaves-Corea, Eduardo Chacón-Madrigal, Wilberth Rodríguez-Alfaro and Freddy Blanco-Montero</i>	25-45
Preliminary study of <i>Fusarium</i> species in pineapple crop (<i>Ananas comosus</i>) in Costa Rica. <i>Mónica Blanco-Meneses, Oscar Castro-Zúñiga and Gerardina Umaña-Rojas</i>	47-64
Infection level of microsporidium <i>Nosema</i> spp. in africanized honey bee colonies and their relationship with precipitation and relative humidity. <i>Rafael A. Calderón-Fallas and Eduardo Moreno-Morales</i>	65-75
“UCR 55” black-seeded Mesoamerican common bean cultivar. <i>Rodolfo Araya-Villalobos, Néstor Felipe Chaves-Barrantes, Juan Carlos Hernández-Fonseca and Carlos Cordero-Morales</i>	77-94
Nitrous oxide fluxes in pastures under different dose of nitrogen fertilization, Northern Colombia. <i>José Luis Contreras-Santos, Manuel Ramón Espinosa-Carvajal, Jorge Cadena-Torres, Judith Martínez-Atencia, Cindy Katherine Falla-Guzmán and Jeyson Fernando Garrido-Pineda</i>	95-109
Cultural-morphometric characterization as a tool for the identification of <i>Fusarium</i> spp., associated with <i>Nicotiana tabacum</i> L. <i>Oandis Sosa-Sánchez, Mirella Romero-Bastidas, Juan José Silva-Pupo, Ramiro Remigio Gaibor-Fernández, Sergio Florentino Rodríguez-Rodríguez and Wilson Geobel Ceiro-Catasú</i>	111-128

Technical notes

<i>Pseudomonas</i> sp on seed emergency and cocoa seedlings development. <i>Yusdel Ferrás-Negrín, Carlos Alberto Bustamante-González and Nosleiby Ortiz-Gómez</i>	129-134
Ecosystem regulation service for a gallery forest from the San Lorenzo Stream, Paraguay. <i>Maura Isabel Díaz-Lezcano, Manuel David Rodríguez-Benítez, Higinio Moreno-Resquín and Cristian Andrés Britos-Benítez</i>	135-146