

## ARTÍCULO ORIGINAL / ORIGINAL ARTICLE

### RESPUESTAS FISIOLÓGICAS DE *HIBISCUS ROSA-SINENSIS* L. (MALVACEAE) EN EL CERRO “EL AGUSTINO”, LIMA, PERÚ

### PHYSIOLOGICAL RESPONSES OF *HIBISCUS ROSA-SINENSIS* L. (MALVACEAE) AT “EL AGUSTINO” HILL, LIMA, PERU

<sup>1</sup>Rafael La Rosa; Rosalyn Acuña; Karina Acurio; Adelina Castillo; Carla Cepeda; Cristhian Chavarry; Marko Correa; Luis De la Cruz; Mary García, Miluska Huamani; Julio Jáuregui; Luz Luyo & Fiorella Villanueva

<sup>1</sup>Laboratorio de Ecofisiología Vegetal. Escuela de Biología. Facultad de Ciencias Naturales y Matemática. Universidad Nacional Federico Villarreal. Calle Rio Chepén s/n, El Agustino. Lima 10.  
Correo electrónico: Fisiologiav@hotmail.com

The Biologist (Lima) 9(1): 1-8.

#### ABSTRACT

Physiological responses of *Hibiscus rosa-sinensis* L. (Malvaceae) were evaluated during April – June 2010. Four plants cultivated in introduced agricultural soil located on El Agustino hill, El Agustino district, Lima, Peru were randomly selected. During the period evaluated air temperature dropped from 29.4°C to 17.2°C and relative humidity increased from 40.50 to 79.75%. Leaf area temperature showed only a slight decrease of 23.8 °C to 16.5 °C compared to the air temperature. The soil was characterized as sandy with a pH of 7.8 and a conductivity of 2.1 mS. Irrigation was registered only one day; the pH of irrigation water was 8.4 with an electrical conductivity of 8.4 mS. The relative water content decreased from 55.3% to 33.8%, whereas percentage of open stomata increased from 73 to 83%; the rate of chlorophyll a/b was 2 and the product of plant biomass was 25%. Finally, we propose that probably *H. rosa sinensis* osmoregulates in its roots in order to tolerate environmental conditions in the hill.

**Keywords:** chlorophyll, *Hibiscus rosa-sinensis*, osmoregulation, physiological response.

#### RESUMEN

Se evaluaron las respuestas fisiológicas de *Hibiscus rosa sinensis* L. (Malvaceae) durante abril a junio del 2010. Cuatro plantas cultivadas sobre suelo agrícola introducido en el cerro “El Agustino”, distrito del Agustino, Lima, Perú se seleccionaron al azar. Durante el periodo de evaluación se observó un descenso de la temperatura del aire de 29,4°C a 17,2°C y la humedad relativa aumentó de 40,5% a 79,7%. La temperatura registrada en el área foliar mostró sólo un ligero descenso de 23,8°C a 16,5°C en comparación a la temperatura del aire. El suelo se caracterizó por ser arenoso con un pH de 7,8 y una conductividad eléctrica de 2,1 mS. Una sola vez se registró riego por inundación, el pH del agua de regadío fue de 8,4 y su conductividad de 0,4 mS. El contenido relativo de agua de las plantas disminuyó semanalmente de 55,3% a 33,8%, mientras el porcentaje de estomas abiertos se incrementó de 73% a 83%. La relación de clorofila a/b fue de 2 y el producto de biomasa vegetal fue del 25%. Finalmente se propone que probablemente *H. rosa-sinensis* realiza una regulación osmótica radicular para tolerar las condiciones ambientales del cerro.

**Palabras clave:** clorofila, *Hibiscus rosa-sinensis*, osmorregulación, respuesta fisiológica.

## INTRODUCCIÓN

El agua es el componente químico más abundante en las plantas. Normalmente en los tejidos activos alcanza valores entre el 90-95% en peso. En cambio en los órganos en dormición o en quiescencia, su descenso es un mecanismo central en la regulación de inactividad. Por lo que, el agua es uno de los factores ecofisiológicos que condicionan el crecimiento y desarrollo de las plantas (Barceló *et al.* 2005).

*Hibiscus rosa-sinensis* L. (Malvaceae), es originaria del Asia tropical (Silva *et al.* 2001) y es considerada un arbusto perennifolio leñoso con abundante mucílago en sus hojas que alcanza hasta 2,5 m de alto (Nwachukwu *et al.* 2008). Prefiere suelos neutros o ligeramente básicos y necesita estar expuesta la mayor parte del día a la luz para su óptimo desarrollo (Burkill 1995). Además, esta especie se caracteriza por crecer en suelos muy drenados, ricos en materia orgánica y altamente fértiles, a una temperatura promedio de 13 a 21°C, siendo muy sensibles a las heladas (Jun *et al.* 1994, López 2006).

El objetivo del presente estudio fue determinar las respuestas fisiológicas de *H. rosa-sinensis*, ante las variaciones ambientales suscitadas entre los meses de abril a junio del 2010, correspondiente a la estación otoñal en el cerro “El Agustino” en la costa central del departamento de Lima, Perú.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en las faldas del Cerro “El Agustino” aledaño al predio 16 de la Universidad Nacional Federico Villarreal (UNFV), distrito de El Agustino (12°02'35.14”S 76°59'30.82”W 226 msnm),

departamento de Lima, Perú durante los meses abril a junio de 2010. Este ecosistema se encuentra en un desierto desecado - subtropical (dd-S) (Holdrige 1962) sin lluvia de verano, cuyo régimen hídrico se caracteriza por una precipitación anual de 437 mm, concentrada en los meses de junio a agosto y con temperaturas medias anuales de 17°C a 19°C (SENAMHI 2010).

Se seleccionaron al azar cuatro individuos de *H. rosa-sinensis* plantados en la falda del cerro “El Agustino” a los cuales se les había adicionado suelo agrícola con alto contenido de materia orgánica y con una mayor retención de agua para el establecimiento de la planta. Sólo se observó un riego por inundación a la mitad del periodo evaluado. Los muestreos se realizaron cada siete días, entre las 9:00-10:00 h del día, debido que a esa hora se observaron mejor los cambios climáticos en el cerro.

### Temperatura y humedad relativa:

Las medidas fueron tomadas cada 10 min en los días correspondientes a la evaluación, se utilizó un termo higrómetro (Radioshack 63-1032®).

### Textura, conductividad eléctrica y pH del suelo:

Se extrajeron dos muestras de suelo de la capa arable ( $S_A$ : en la base del arbusto y  $S_B$ : a 1m aprox. de distancia del arbusto). Para la determinación de la textura se colocó 7 cm<sup>3</sup> de cada una de las muestras en tubos para centrifuga de 14 mL (tres repeticiones por muestra) y se añadió un volumen igual de agua destilada. Se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min y se midieron las proporciones de cada una de las capas obtenidas de arena, arcilla y limo. Finalmente se promediaron estos datos y se compararon con el triangulo de texturas de suelo (USDA 2010). A la solución sobrenadante de los tubos centrifugados se le midió la conductividad eléctrica y el pH.

También se tomaron estos parámetros para el análisis fisicoquímico del agua de riego.

**Porcentaje de humedad del suelo (% HS):**

Para el cálculo del porcentaje de humedad de suelo se pesaron 200 g (Pf) de S<sub>A</sub> y S<sub>B</sub>, luego fueron llevados a la estufa por 72 h a 100° C, después de este tiempo se volvió a pesar (Ps) y se determinó la humedad del suelo aplicando la siguiente fórmula:

$$\% HS = \frac{Pf - Ps}{Ps} \times 100$$

donde HS = Humedad del suelo. Pf = peso fresco. Ps = peso seco.

**Análisis del contenido relativo de agua (CRA):**

Se cortaron aproximadamente 60 discos de la tercera hoja de cada individuo, con ayuda de un sacabocados. Se pesaron los discos en una balanza analítica digital (A&D, GR-200®, A&D Company, Ltd., Japón) (peso fresco), luego se les embebió en agua destilada por 1 h y se registró el nuevo peso (peso fresco total). Finalmente se colocó en la estufa a 80° C durante 24 h y se volvió a pesar (peso seco). Una vez obtenidos los tres pesos se calculó el porcentaje de agua presente en la hoja mediante la siguiente fórmula:

$$\% CRA = \frac{(Pf - Ps)}{(Pft - Ps)} \times 100$$

donde CRA = contenido relativo de agua. Pf = peso fresco. Pft = peso fresco total. Ps = peso seco.

**Apertura estomática de la hoja:**

En el ensayo se tomó la tercera hoja contando desde el ápice de la planta, a la cual se le impregnó 4 capas de esmalte incoloro por el envés. Una vez secado se retiró la película formada y se observó al microscopio a 400X y se contabilizó el número de estomas abiertos (E<sub>A</sub>) y estomas cerrados (E<sub>C</sub>). Con ayuda de la cámara de Neubauer, se hizo una proyección entre lo encontrado en el área del campo y el área foliar.

**Porcentaje de materia seca (determinación indirecta de la actividad fotosintética):**

Se extrajo y se pesó (peso fresco P<sub>f</sub>), una rama (tallo y hojas) de 25cm, por cada individuo, teniéndose al final cuatro ramas. Luego se llevo a la estufa a 80° C por 72 h y se volvió a pesar (peso seco P<sub>s</sub>), para determinar el porcentaje de materia seca. Se empleó la siguiente fórmula:

$$\% MS = \frac{Ps}{Pf} \times 100$$

donde MS = materia seca. Ps = peso seco. Pf = peso fresco.

**Cuantificación de clorofila:**

Se pesó 1 g de las terceras hojas totalmente expandidas desde el ápice de las ramas, las cuales se trituraron en un mortero adicionando acetona hasta obtener una pulpa fina, se filtró y se enrasó a 10mL con acetona. Luego se hizo la dilución 1 en 10 obteniéndose un volumen final de 100 mL (V). Se midió la absorbancia de esta solución en un Espectrofotómetro UV visible (Thermo Scientific, Biomate 35® Thermo Fisher Scientific Inc., Madison, WI, USA) a dos longitudes de onda (645nm y 663 nm) y se aplicaron las siguientes fórmulas:

$$\text{Clorofila a (mg peso fresco)} = \frac{\{12,7 (A 663) - 2,69 (A 645)\} \times V}{(1000 \times P)}$$

$$\text{Clorofila b (mg peso fresco)} = \frac{\{22,9 (A 645) - 4,68 (A 663)\} \times V}{(1000 \times P)}$$

Donde A 645 = absorbancia a 645 nm. A 663 = absorbancia a 663 nm. V = volumen final del filtrado, P = peso fresco en g de la muestra.

**Diseño experimental:**

No se siguió ningún diseño estadístico específico debido a que las cuatro plantas seleccionadas al azar, no fueron sometidas a ningún tipo de tratamiento, solamente se registraron las respuestas fisiológicas para luego ser interpretadas.

## RESULTADOS

En la figura 1, se observa la relación entre la humedad relativa del aire y la temperatura ambiental, que se presentan de manera inversa. Sin embargo, la temperatura del follaje va decayendo lentamente.

Otro valor ambiental importante es el suelo, en donde el análisis granulométrico demuestra que la textura es predominantemente arenosa (Arena = 74%; Arcilla = 23,5% y Limo = 2,5%). Los parámetros fisicoquímicos indican que los suelos son ligeramente básicos, pero con un contenido alto de sales en la muestra más alejada de la planta ( $S_B$ ), que dista considerablemente de  $S_A$ , ya que le fue agregada tierra agrícola antes de que las plantas sean ubicadas en el sitio (Tabla 1).

Debido a estas condiciones del suelo, es que éste no presenta mucha retención de agua, para ambas zonas muestreadas ( $S_A$  y  $S_B$ ) (Fig. 2), a pesar que en la segunda semana de evaluación las plantas fueron regadas, con un pequeño incremento de agua. Los efectos de estas condiciones sobre las plantas se ven reflejados en los valores de contenido relativo de agua (Fig. 3), el cual muestra un descenso a pesar que la humedad relativa del aire iba en aumento (Fig. 1). En la Fig. 4, se observa la variación de la apertura estomática, la cual muestra una disminución del cierre estomático, debido a que hay más agua, tanto en el aire (Fig. 1) como en el suelo (Fig. 2).

El efecto del ambiente sobre la fotosíntesis se muestra en la Tabla 2, en donde los valores de biomasa vegetal nos indican que sólo la cuarta parte del peso de las ramas es materia seca y el resto es agua; además, en la Tabla 3 se muestran los valores de clorofila en donde observamos que la síntesis de clorofila no se ve afectada por las condiciones ambientales en que viven los individuos de esta especie.

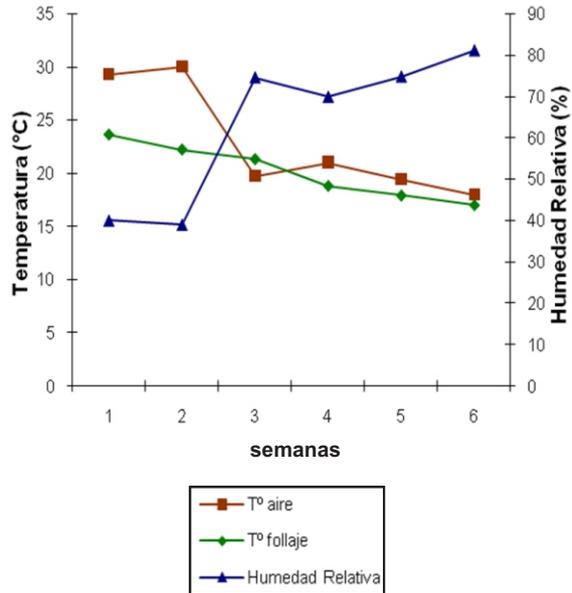


Figura 1. Relación entre temperatura del aire, humedad relativa del aire, temperatura de follaje durante todo el tiempo que duró el trabajo experimental en el cerro “El Agustino”, Lima, Perú.

Tabla 1. Valores promedio de Conductividad eléctrica (CE) y pH del suelo ( $S_A$  y  $S_B$ ) y del agua de riego.  $S_A$ : suelo en la base de la planta.  $S_B$ : suelo a aproximadamente 1 m de la planta.

Muestra	CE(mS)	pH
$S_A$	2,2	7,8
$S_B$	21,3	7,5
Agua	0,4	8,4

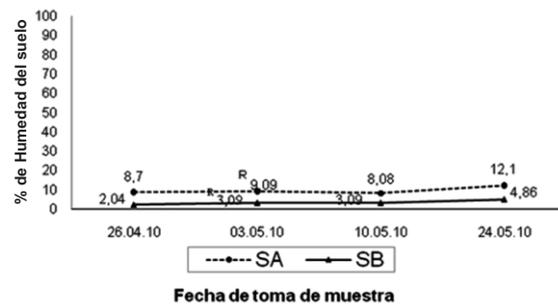


Figura 2. Valores promedio del porcentaje de Humedad del suelo durante las cuatro evaluaciones en el cerro “El Agustino”, Lima, Perú.. Donde R representa el día que se regaron las plantas.  $S_A$ =Suelo en la base de la Planta.  $S_B$ = Suelo a aproximadamente 1m de la planta.

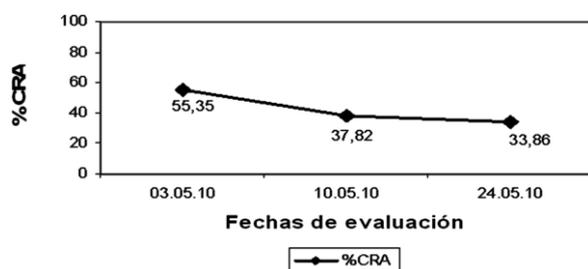


Figura 3. Datos promedio del Contenido relativo de agua foliar (CRA) en *Hibiscus rosa-sinensis*.

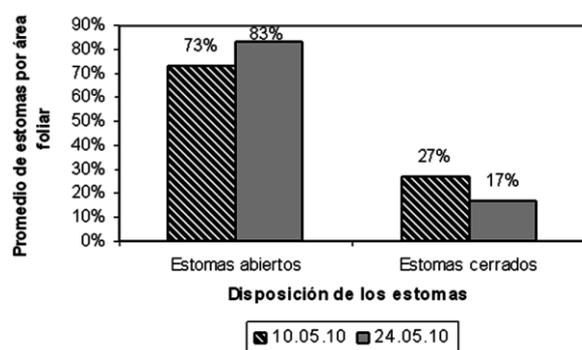


Figura 4. Apertura estomática en *Hibiscus rosa-sinensis*.

**Tabla 2.** Valores promedio de peso fresco (Pf) y peso seco (Ps) de biomasa de *H. rosa-sinensis*. Se presenta el promedio de 4 ramas (1 por individuo). La muestra se tomó al final del experimento. Desviación estándar = DE.

muestra	Pf	Ps	% biomasa
A	33,20	6,50	19,58
B	21,10	5,40	25,59
C	31,70	9,00	28,39
D	23,50	6,40	27,23
promedio	27,38	6,83	25,20
DE	5,97	1,53	3,91

**Tabla 3.** Cuantificación de la clorofila a y b de hojas de *H. rosa-sinensis* expuestas al sol.

Cuantificación de clorofila a y b	
mg Cl a/g	0,427
mg Cl b/g	0,213
Relación Cl a/b	2,004

## DISCUSIÓN

Es importante darse cuenta que la humedad relativa cambia con la temperatura, la presión y el vapor de agua contenido (INTA 2003), que en nuestro caso vemos que esta interacción, entre temperatura y humedad relativa del aire, se da en forma inversa, es decir, mientras la temperatura desciende la humedad relativa aumenta (Fig. 1), lo cual coincide con Salas & Sánchez (2006). Sin embargo la temperatura en el follaje se mantuvo homogénea debido a que la planta puede modular la temperatura mediante transpiración foliar (Molina-Montenegro 2008).

El suelo sobre el cual se desarrolla esta especie, es ligeramente básico (Tabla 1). Sin embargo, *H. rosa-sinensis* tiene un desarrollo óptimo en sustratos ligeramente ácidos (pH = 6,2-6,5) llegando a tolerar un pH de hasta 7,5 (Lawton 2004). La conductividad eléctrica en  $S_A$  es de 2,15 mS, ligeramente salino pero permisible para *H. rosa-sinensis*. Sin embargo,  $S_B$  presentó una conductividad eléctrica muy elevada (21,3 mS) probablemente por el movimiento ascendente del agua desde las capas inferiores hasta la superficie por capilaridad, que al llegar se evapora y las sales precipitan, acumulándose paulatinamente, y debido al movimiento del agua de regadío (riego por inundación), con lo cual puede arrastrar estas sales que se acumulan paulatinamente en el sustrato (Núñez 1981).

Aún cuando hubo riego en la segunda fecha de evaluación, el porcentaje de humedad del suelo fue menor al 13% (Fig. 2), esto por ser un suelo predominantemente arenoso, con un drenaje considerable del agua y por lo tanto con poca retención (FAO 2000); por ello la poca frecuencia de riego solo fue favorecida

por la condensación foliar de la elevada humedad del aire, simulando el efecto Lomas (Mendoza 2006).

Estas condiciones estresantes determinaron las respuestas fisiológicas en la planta, las cuales se reflejan en la resistencia que presenta al estrés hídrico (Fernández & Johnston 1986). La respuesta primordial es el ajuste osmótico que *H. rosa-sinensis* realiza a nivel radicular, lo cual se reflejó en la irregularidad del potencial hídrico, así como en la disminución del % CRA foliar (Fig. 3), siendo estos parámetros los que indican la capacidad de la planta para mantener un equilibrio en su estado hídrico a pesar de las condiciones estresantes, de déficit (Acevedo *et al.* 1998).

El porcentaje de estomas abiertos superaron el 70% en las evaluaciones (Fig. 4), a pesar del déficit hídrico, en el suelo como consecuencia del ajuste osmótico, proceso que consiste en la acumulación activa de solutos en tejidos de la planta en respuesta a una disminución de la disponibilidad de agua. Con ello disminuye el potencial de solutos y el potencial hídrico total de tallos, hojas, y raíces (Girma & Krieg 1992). Por lo que *H. rosa-sinensis* puede absorber agua a potenciales hídricos del suelo menores, y mantener la presión de turgor y la actividad fisiológica relacionada al contenido hídrico en los tejidos a condiciones normales (Acevedo *et al.* 1999). También, este alto % de estomas abiertos es debido a la alta HR del aire (Fig.1).

El rol de los estomas en la planta es relevante, al regular el intercambio hídrico con la atmósfera, ligado a la absorción de CO<sub>2</sub>, que es inducido por la luz en los espacios intercelulares, conciliando así la transpiración y la fotosíntesis (Alpi & Tognoni 1990). En *H. rosa-sinensis* es elevado el porcentaje de estomas abiertos (>70%), ya que la apertura estomática no necesariamente depende del potencial hídrico (Jones 1996).

Por lo que se tendrá un incremento en la actividad fotosintética, lo cual permite una mejor producción de biomasa vegetal, evidenciándose en el porcentaje de materia seca (Tabla 2).

En el cociente de la concentración de clorofila a y b, se observó una relación (cl A/ cl B) de 2 (Tabla 3), teniendo menor cantidad de clorofila b, debido a que sirve como pigmento accesorio y protege del daño oxidativo a la clorofila a (Sitte *et al.* 2004). Esta característica se encuentra en hojas que están expuestas a luz directa (Jones 1996), por lo que se puede afirmar que el estrés hídrico al que están sometidas estas plantas no produce alteraciones en la síntesis de la clorofila a y b.

De acuerdo a Taiz & Zeiger (2006), en razón a la tolerancia de la planta como respuesta a la exposición de condiciones de estrés y teniendo en cuenta su capacidad de mantener su crecimiento y procesos de asimilación primaria, *H. rosa-sinensis* sería una especie aclimatada, pero no adaptada, a las condiciones del cerro "El Agustino", Lima, Perú.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acevedo, E.; Silva, P. & Silva, H. 1998. Tendencias actuales de la investigación en la resistencia al estrés hídrico de las plantas cultivadas. Boletín técnico (Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales), 49: 1-28.
- Acevedo, E.; Silva, P. & Silva, H. 1999. *Wheat production in Mediterranean environments*. pp. 295-331. En: Satorre, E.H. & Slafer, G.A. (eds). *Wheat ecology and physiology of yield determination*. The Haworth Press, New York, USA. Disponible en: <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2063245> leído el 20 de noviembre del 2010.

- Alpi, A. & Tognoni, F. 1990.** *Cultivo en invernadero*. pp. 96-110. 3<sup>era</sup> Ed. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid - España.
- Barceló, J.; Nicolás, G.; Sabater, R. & Sánchez, R. 2005.** *Fisiología Vegetal*. Ed. Pirámide. España.
- Burkill, H.M. 1995.** *The useful plants of West Tropical Africa*. pp. 654 - 670. 2<sup>nd</sup> Ed. Royal Botanic Gardens Kew.
- FAO.2000.** *Manual on integrated soil management and conservation practices*. In: FAO Land and Water Bulletin No. 8. FAO, Roma. 214 p.
- Fernández, G. & Johnston, M. 1986.** *Fisiología Vegetal Experimental*. pp. 139-142. Servicio Ed. IICA. Serie de Libros y Materiales Educativos. San José de Costa Rica.
- Girma, F.&Krieg,D.1992** Osmotic adjustment in sorghum. *Plant Physiology*, 99: 577-582.
- Holdridge, L. R. 1962.** The determination of atmospheric water movements. *Ecology*, 3:1-9.
- INTA (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias). 2003.** Agrometeorología. Disponible en <http://www.inta.gov.ar/barrow/met/refer.htm> leído el 20 de noviembre de 2010.
- Jones, H. 1996.** *Plants and microclimate: a quantitative approach to environmental plant physiology*. Cambridge University Press. 2<sup>nd</sup> Ed. 428 p.
- Jun, L.; Hidaka, M. & Masaki, H. 1994.** Isolation and culture of protoplast from callus of four cultivars of *Hibiscus rosa-sinensis*. *Plant tissue letters*, 11: 233-236.
- Lawton, B. 2004.** *Hibiscus: Hardy and tropical plants for the garden*. Vol. 1: pp. 53-78. Workman Pub Co. UK.
- López, D. 2006.** *Mejora Genética y producción de Hibiscus rosa-sinensis*. Semilleros Saliplant S.L. - Producción de Ornamentales. España. Disponible en: [http://www.maa.gba.gov.ar/agricultura\\_ganaderia/floricultura/MACRO%20MICRO%20PROPAG/67.%20Efeit%20de%20acido%20indolbut%EDrico%20Hibiscus.doc](http://www.maa.gba.gov.ar/agricultura_ganaderia/floricultura/MACRO%20MICRO%20PROPAG/67.%20Efeit%20de%20acido%20indolbut%EDrico%20Hibiscus.doc) leído el 25 de noviembre del 2010.
- Mendoza, A. 2006.** Biodiversidad y sustentabilidad de las ciudades costeras, necesidad de mantener áreas naturales de vida silvestre en la ciudad. *The Biologist (Lima)*, 4:4-5.
- Molina-Montenegro, M. 2008.** Variación de la pubescencia foliar en plantas y sus implicaciones funcionales a lo largo de gradientes altitudinales. *Ecosistemas*, 17: 146-154.
- Núñez, J. 1981.** *Fundamentos de Edafología*. Vol. 2. Ed. UNED, San José, Costa Rica.
- Nwachukwu, C.; Mbagwu, F. & Iwu, J. 2008.** Anatomical features of the roots and leaves of *Hibiscus rosa-sinensis* and *Abelmoschus esculenta*. *New York Science Journal*, 1: 27-32.
- Salas, W. & Sánchez, B. 2006.** Avances en el control biológico de *Botrytis cinerea* en Chile y tomate cultivados bajo techo. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)*, 78: 5- 7.
- SENAMHI. 2010.** Disponible en: <http://www.senamhi.gob.pe/> leído el 10 agosto 2010.

**Silva, P.; Ramos, D. & Laschi, D. 2001.** Efecto do Ácido Indolbutírico (IBA) no enraizamento de estacas de variedades de *Hibiscus* (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) sob nebulização intermitente. Botucatu: UNESP-FCA. Departamento de Produção Vegetal-Horticultura. Disponible en: URL: [www.maa.gba.gov.ar/.../67.%20Efeito%20de%20acido%20indolbutirico%20Hibiscus.doc](http://www.maa.gba.gov.ar/.../67.%20Efeito%20de%20acido%20indolbutirico%20Hibiscus.doc) leído el 22 de noviembre del 2010.

**Sitte, P.; Weiler, E. & Kadereit, J. 2004.** *Strasburger: Tratado de Botánica*. Ed. Omega. Barcelona. 1152 p.

**Taiz, L. & Zeiger E. 2006.** *Fisiología Vegetal* Vol. 2. pp. 1129-1143. Universitat Jaume I. U.S.A.

**USDA (United States Department of Agriculture). 2010** *Soil Survey Staff, Natural Resources Conservation Service. Soil Series Classification Database*. Disponible en: <http://soils.usda.gov/soils/technical/classification/scfile/index.html>. USDA-NRCS, Lincoln, NE leído el 10 de febrero del 2010.

Fecha de recepción: 20 de octubre del 2010.

Fecha de aceptación: 14 de marzo del 2011.