ITEA (1996), Vol. **92V N.º 3,** 202-213

FECUNDACIÓN Y VIABILIDAD DEL PISTILO EN DOS VARIEDADES DE CEREZO CULTIVADAS EN CALATAYUD (ZARAGOZA)

M.V. Andrés[1]
E. Rodríguez Almazán[2]
J.M. Durán[1,*]

1. Departamento de Producción Vegetal: Fitotecnia, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Ciudad Universitaria 28040 Madrid

2. Agrupación Española de Entidades Aseguradoras de los Seguros Agrarios Combinados, S.A. (AGROSEGURO)

RESUMEN

La influencia de las condiciones ambientales sobre la fecundación y la incidencia de las temperaturas bajo cero sobre la viabilidad del fruto, fueron estudiadas en dos cultivares de cerezo (*Prunus avium* L.): "Monzón" y "De la Rosa". Las observaciones encaminadas a estudiar el crecimiento del tubo polínico y la fecundación se efectuaron utilizando microscopía de fluorescencia. Los daños que la formación de hielo podía producir en los tejidos se determinaron mediante la observación microscópica de cortes del ovario (30–40 μm) previamente teñidos con Safranina y *Fast–Green*. En las condiciones ambientales en las que se realizó el ensayo, el porcentaje de fecundación fue similar en los dos cultivares estudiados. La permanencia durante dos días consecutivos a temperaturas comprendidas entre 0 y –2.5 °C, durante 4 h, dañó los tejidos del ovario. Los daños se incrementaron sensiblemente cuando la temperatura estuvo comprendida entre –3 y –6 °C y el tiempo de exposición fue de 8 h.

Palabras clave: Fecundación, Heladas, Microscopía de fluorescencia, *Prunus avium* L.

SUMMARY

The influence of environmental conditions on fertilization and the incidence of below– zero temperatures on fruit viability were studied in two cultivars of cherry (*Prunus avium* L.): "Monzón" and "De la Rosa". Pollination and fertilization observations were carried out using fluorescence microscopy. The damage induced by ice formation were determinated by observation of microscopic sections (30–40 μm) of the ovary, previously stained with Safranine and Fast–green. Under the environmental conditions of the experiment, fertilization rate was similar for the two cultivars studied. Two consecutive days at temperature between 0 and –2.5 °C, during 4 h, injured the ovary. The damage increased at temperatures between –3 and –6°C during 8 h under frost temperature.

Key words: Fertilization, Chilling injury, Fluorescence microscopy, *Prunus avium* L.

* Autor a quien debe dirigirse la correspondencia

Introducción

Según el Anuario de Estadística Agraria (MAPA, 1995), la producción de cerezas y guindas ha experimentado un gran incremento en los últimos años, recuperándose así del descenso sufrido a finales de la década anterior. La producción ha pasado de 42.900.000 kg en 1988 hasta más de 80.000.000 kg producidos en 1993. La misma tendencia se observa en las exportaciones; mientras que en 1990 fueron de 352.000 kg, en 1992 llegaron a 7.070.000 kg. Las principales provincias españolas productoras de cereza son Cáceres y Zaragoza, produciendo entre ambas aproximadamente el 50 % del total nacional.

El cerezo es una especie que, según LICHOU *et al.* (1990), presenta una gran irregularidad de producción, provocada frecuentemente por las condiciones adversas durante la polinización y crecimiento del tubo polínico, sobre todo si tenemos en cuenta que se trata de una especie en la que el estilo degenera muy rápidamente y que la longevidad del óvulo apenas sobrepasa los cuatro ó cinco días. SAUNIER *et al.* (1989) restringen aún más este tiempo al considerar que la receptividad media de los estigmas se mantiene durante un período de 2 a 3 días a partir de la apertura de la flor. Estos autores también mantienen que desde que el grano de polen es depositado sobre el estigma, son necesarias de 48 a 72 h para que el tubo polínico llegue hasta el óvulo cuando la temperatura es de 21 °C. A temperaturas más elevadas (24–26 °C) el crecimiento será más rápido y si la temperatura no sobrepasa los 10–12 °C, el crecimiento será muy lento.

Las irregularidades en la producción pueden ocasionar problemas para cuantificar la Producción Real Esperada (PRE), que es uno de los factores determinantes tanto en la contratación de un Seguro Agrario, según aparece reflejado en la Orden Ministerial de 21.12.94 (BOE: 5.1.95), como en el pago de la indemnización en caso de siniestro.

Conocedores de esta problemática, la Agrupación Española de Entidades Aseguradoras de los Seguros Agrarios Combinados, S.A. (AGROSEGURO) inició en 1994 un estudio sobre la fecundación del cerezo en dos de las principales zonas productoras de España: Calatayud (Zaragoza) y Valle del Jerte (Cáceres).

El primer dato con el que debemos contar para estimar la cosecha de un cultivo es conocer las posibles irregularidades que pueden producirse durante la polinización y fecundación. La microscopía de fluorescencia nos ofrece la posibilidad de estudiar este proceso desde que el grano de polen cae en el estigma hasta que el tubo polínico llega al óvulo (MARTIN, 1958; KHO y BAËR, 1968). En frutales, esta técnica ha sido utilizada con éxito, en manzano (KRYLOVA, 1979), peral (VASILAKAKIS y PORLINGIS, 1985) y melocotonero (ARBELOA y HERRERO, 1987; HERRERO y ARBEOLA, 1989).

Respecto al cerezo citaremos el trabajo realizado por GUERRERO-PRIETO *et al.* (1985) en el que, utilizando microscopía de fluorescencia, observaron que la temperatura óptima para el crecimiento del tubo polínico dependía del genotipo. KUEHN (1988), utilizando la misma técnica, intentó explicar el bajo cuajado de frutos que en sus condiciones de trabajo presentó el cerezo ácido.

Otra causa de la baja producción en los frutales de hueso son las heladas primaverales, las cuales pueden llegar a lesionar la flor o el fruto de forma irreversible. Estas lesiones son fáciles de detectar observando al microscopio óptico cortes semifinos de

los tejidos de la estructura que se pretende estudiar (MODLIBOWSKA, 1961; NERI y FILITI, 1989).

Los objetivos de este trabajo son:

1. Estudiar la influencia de las condiciones ambientales sobre la fecundación de dos cultivares de cerezo ("Monzón" y "De la Rosa") cultivadas en Calatayud (Zaragoza) en dos parcelas situadas a 750 y 900 m sobre el nivel del mar.

2. Determinar la incidencia de las temperaturas bajo cero sobre la viabilidad de los frutos de los dos cultivares de cerezo anteriormente mencionados: "Monzón" y "De la Rosa".

Material y métodos

Para realizar el estudio de fecundación se recolectaron 25 pistilos de cada variedad, tomados en distintas fechas y estados fenológicos (Cuadro 1). Las muestras recolectadas se fijaron en FAA (5 % de formaldehido al 40 %, 5 % de ácido acético glacial y 90 % de etanol al 70 %) y se enviaron al laboratorio, en frascos de plástico de 60 ml.

Los estudios de polinización, crecimiento del tubo polínico y fecundación se efectuaron utilizando la microscopía de fluorescencia, según la técnica descrita por MARTIN (1958). La misma técnica también fue utilizada por STÖSSER y ANVARI (1983) para estudiar tanto el crecimiento del tubo polínico como la senescencia de los óvulos de cerezo.

Durante el tiempo que duró la experiencia se realizó un registro diario de las temperaturas (Fig. 1) utilizando un *data–logger* miniaturizado situado en la misma parcela.

A partir del 13 de Abril de 1994, cuando se observaron temperaturas bajo cero que podían haber afectado el desarrollo del fruto, las muestras recolectadas y fijadas de la forma anteriormente descrita se observaron a nivel macroscópico y microscópico y se determinó el daño que las bajas temperaturas habían producido en los frutos recién cuajados. Las observaciones macroscópicas, tanto del óvulo como del ovario, se realizaron con la ayuda de una lupa binocular.

La formación de hielo en los tejidos puede ocasionar su deshidratación y rotura. Para determinar ambos efectos se realizaron cortes del ovario (30–40 μm), se tiñeron con Safranina y *Fast–Green* (NERI y FILITI 1989) y se observaron al microscopio óptico. La cuantificación de los daños que se produjeron, tanto a nivel macroscópico como tisular, se realizó siguiendo la valoración indicada en el Cuadro 2.

El porcentaje de fecundación se determinó en función del estado fenológico, del cultivar y de la parcela de procedencia. De la misma forma, también se evaluó el daño que la falta de fecundación y/o las bajas temperaturas habían producido en los pistilos.

Cuando los pistilos pertenecientes al mismo estado fenológico presentaron tamaños diferentes, las muestras se agruparon en función del tamaño y fueron analizadas por separado.

La comparación entre los porcentajes de fecundación se efectuó mediante el test Z (ZAR, 1984), comúnmente utilizado para comparar los porcentajes de una distribución binomial:

$$Z = | p_1 - p_2 | \sqrt{pq\,(1/n_1 + 1/n_2)}$$

siendo:

CUADRO 1

ESTUDIO DE LA FECUNDACIÓN EN DOS CULTIVARES DE CEREZO CULTIVADOS EN CALATAYUD (ZARAGOZA), DURANTE 1994, EN DOS PARCELAS. LA FECUNDACIÓN SE ESTUDIO, EN ESTADO FENOLÓGICO F, EN FUNCIÓN DEL PORCENTAJE DE PISTILOS CON TUBOS POLÍNICOS PRESENTES EN EL ESTIGMA (STG), ESTILO (STL), OVARIO (OVR), ÓVULO (OVL) Y NO POLINIZADOS (NP). EN LOS ESTADOS FENOLÓGICOS G, H, I Y J SE ESTUDIÓ EN FUNCIÓN DEL PORCENTAJE DE ÓVULOS EN LOS QUE APARECIAN TUBOS POLÍNICOS

TABLE 1

STUDY OF FERTILIZATION IN TWO VARIETIES OF CHERRY CULTIVATED IN CALATAYUD (ZARAGOZA), DURING 1994. THE FERTILIZATION WAS STUDIED IN STAGE F, BY THE PERCENTAGE OF PISTILS WITH POLLEN TUBES PRESENT IN THE STIGMA (STG), STYLE (STL), OVARY (OVR) AND NOT POLLINATED (NP). IN THE STAGES G, H, I AND J THE FERTILIZATION RATE WAS ESTIMATED BY THE PERCENTAGE OF OVULES PRESENTING POLLEN TUBES

Variedad	Parcela[1]	Fecha	Fenología[2]		Situación del tubo polinico				
			Estado	IF	NP	STG	STL	OVR	OVL
"Monzón"	1 (900 m)	28.03	F	0-10	30	25	45	0	–
		05.04	G	11-20					30
		11.04	H	21-30					5
		18.04	H	21-30					25
		25.04	H	21-30					45
	2 (750 m)	28.03	F	0-10	15	5	75	5	–
		05.04	G	11-20					15
		11.04	H	21-30					25
		18.04	H	21-30					6
		18.04	I	31-40					29
		25.04	I	31-40					11
		25.04	J	41-50					100
		04.05	I	31.40					6
		04-05	I	31-40					10
		04-05	I	31-40					10
		04.05	I	31-40					0
		04.05	J	41-50					90
"De la Rosa"	1 (900 m)	28.03	F	0-10	20	30	50	0	–
		05-04	H	21-30					10
		11.04	H	21-30					30
		18.04	H	21-30					5
		25.04	H	21-30					20

1. Entre paréntesis se indica la altitud media de la parcela sobre el nivel del mar.
2. Estado fenológico según FLECKINGER (1945) e índice fenológico (IF) propuesto por los autores, en los que se encontraba cada una de las muestras analizadas.

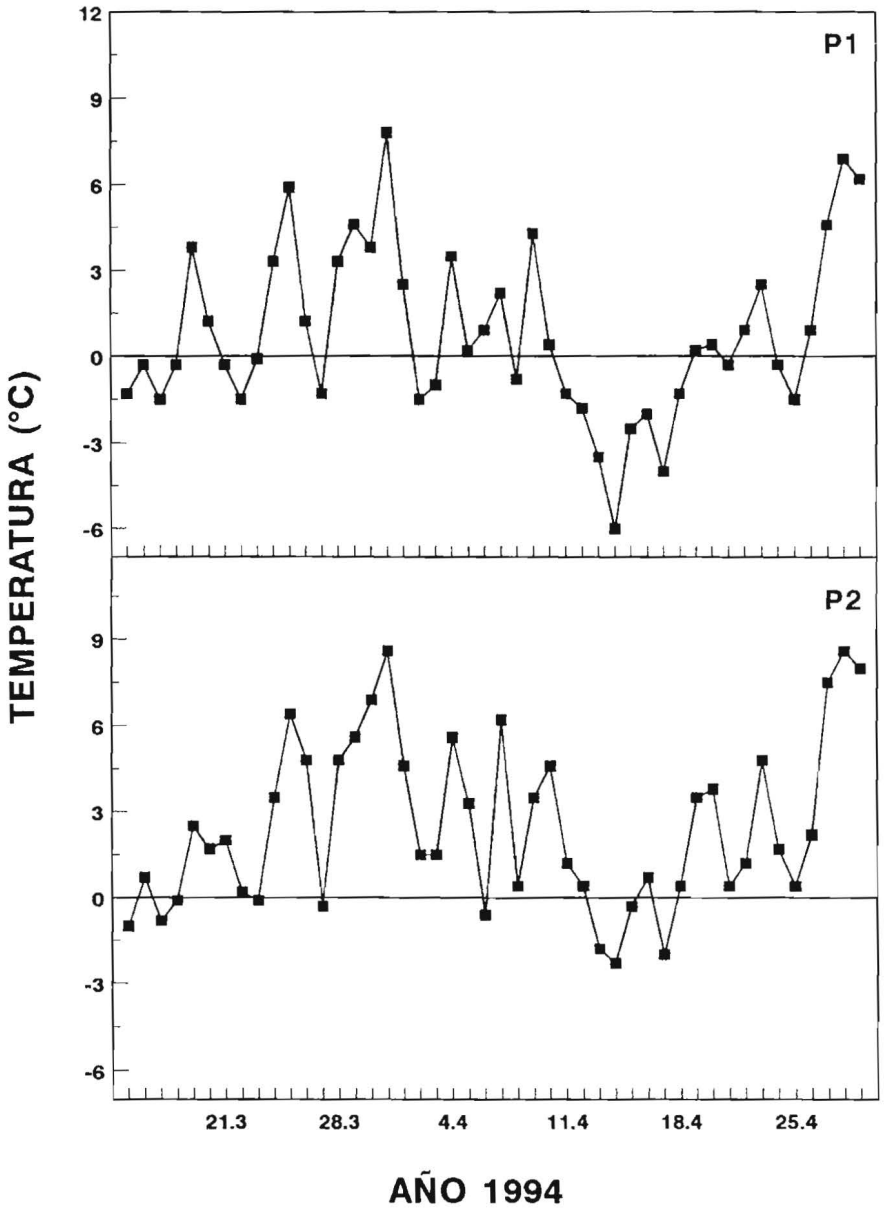


Fig. 1. Temperaturas mínimas registradas durante el período de polinización–fecundación de los cultivares de cerezo "Monzón" y "De la Rosa", cultivados en los parajes denominados Cuesta de la Cabra (P1) y El Fresno (P2) en Aniñón (Zaragoza).

Minimal temperatures recorded during the period of pollination–fertilization of two varieties of cherry ("Monzón" and "De la Rosa"), cultivated in "Cuesta de la Cabra" (P1) and "El Fresno" (P2) in Aniñón (Zaragoza).

CUADRO 2
CUANTIFICACIÓN DE LAS LESIONES QUE A NIVEL MACROSCÓPICO PUEDEN PRODUCIRSE Y OBSERVARSE EN EL OVARIO (OVR) Y ÓVULO (OVL) Y A NIVEL MICROSCÓPICO, EN LOS MISMOS TEJIDOS (TEJ)
TABLE 2
QUANTIFICATION OF THE MACROSCOPIC OBSERVABLE LESIONS PRODUCED IN THE OVARY (OVR), OVULE (OVL) OR TISSUES (TEJ)

Daños	Valor
OVARIO (OVR):	
– Leves: Pardeamiento suave.	1 - 5
– Graves: Deshidratación y/o pardeamiento intenso.	6 - 10
OVULO (OVL):	
– Leves: Pardeamiento suave.	1 - 5
– Graves: Deshidratación y/o pardeamiento intenso.	6 - 10
TEJIDOS (TEJ):	
– Leves: Deshidratación en menos del 25% de la superficie de la muestra.	1 - 5
– Graves: Rotura de tejidos.	6 - 10

p_1 y p_2 = Porcentajes que se comparan.

p = Probabilidad del tratamiento 1 + 2.

$q = 1 - p$

n_1 y n_2 = Número de pistilos observados en los tratamiento 1 y 2.

Resultados y discusión

El Cuadro 1 recoge la situación del tubo polínico en cada uno de los estados fenológicos y fechas en que se recolectaron los pistilos que componían cada muestra.

Para determinar el porcentaje de fecundación de cada parcela y variedad nos hemos basado en los datos que se obtuvieron el 5 de Abril de 1994, fecha en la que ya se había alcanzado el estado fenológico G (FLECKINGER, 1945) y a la vez había transcurrido una semana desde que las flores alcanzaron el estado fenológico F. En este estado, según SAUNIER *et al.* (1989), los tubos polínicos que han germinado y crecido correctamente deben haber alcanzado el óvulo y alguno de ellos haberlo fecundado. Según nuestro criterio, en fechas posteriores los porcentajes de fecundación de las muestras analizadas estarán en función de la cantidad de pistilos no fecundados que vayan cayendo.

El 5 de Abril de 1994, el porcentaje de fecundación del cultivar "Monzón" fue mayor en la parcela 1 que en la parcela 2 (Fig. 2), aunque la diferencia entre la fecundación de ambas parcelas no resultó significativa al nivel de significación del 5 %. En la parcela 1, las temperaturas mínimas fueron algo más bajas que en la parcela 2 (Fig. 1). En fechas posteriores, se observa que, no sólo

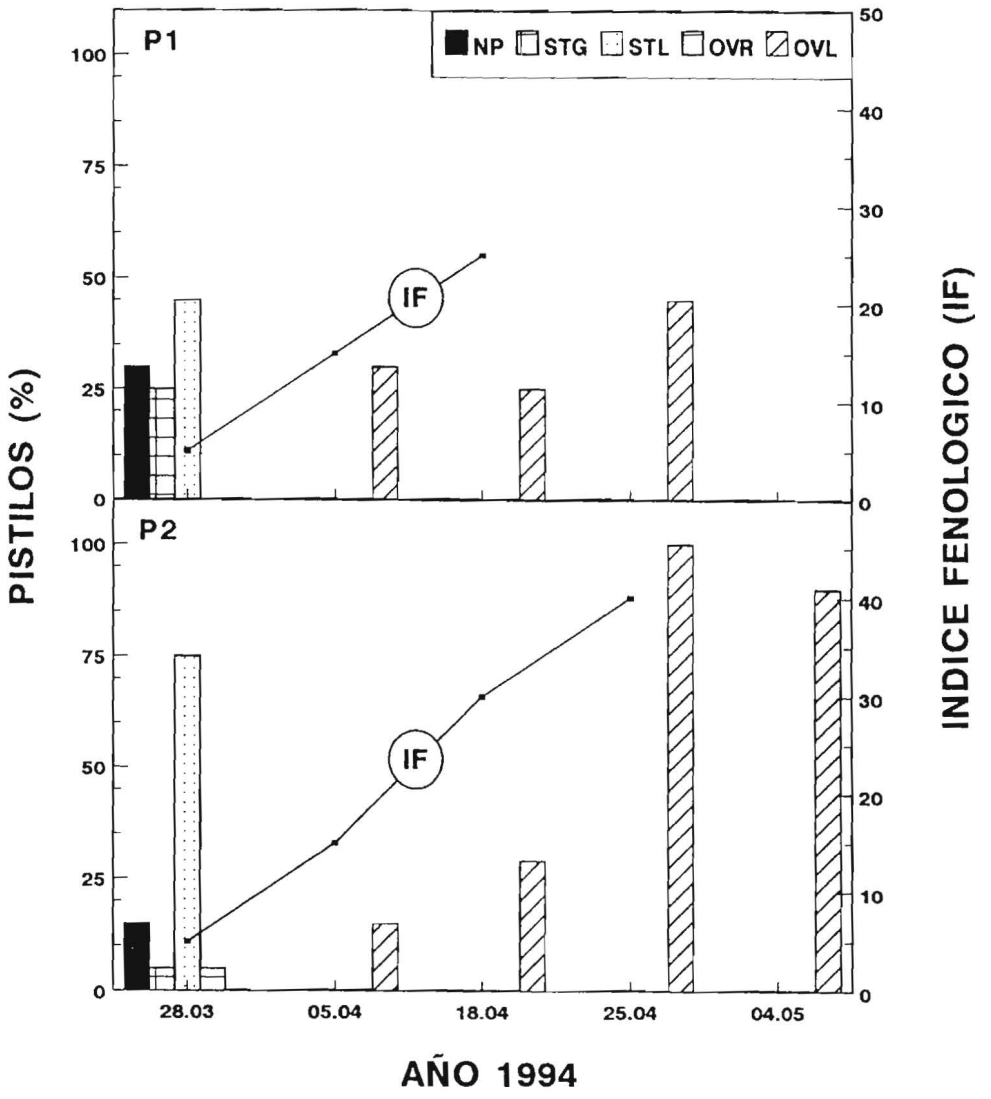


Fig. 2. Porcentaje de pistilos del cultivar de cerezo "Monzón" no polinizados (NP) o con tubos polínicos presentes en el estigma (STG), estilo (STL), ovario (OVR) y óvulo (OVL), en función del tiempo, del estado fenológico y de la altura sobre el nivel del mar a la que se encuentra la plantación: P1 (900 m) y P2 (750 m).

Percentage of pistils of the variety of cherry "Monzón" not pollinated (NP) or with pollen tubes present in the stigma (STG), stile (STL), ovary (OVR) and ovule (OVL), according to the date of sampling, phenological stage and the height on the sea level of the plantation: P1 (900 m) and P2 (750 m)

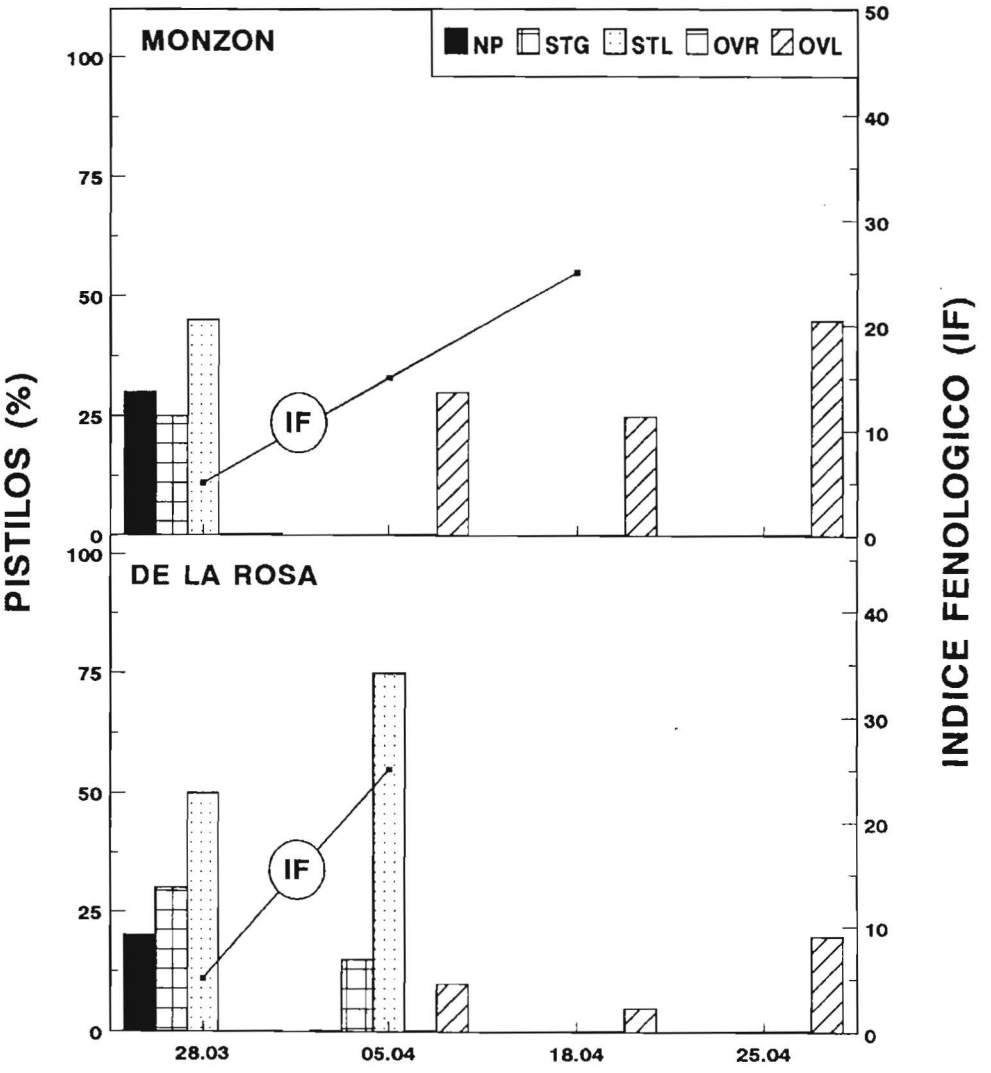


Fig. 3. Porcentaje de pistilos de los cultivares de cerezo ("Monzón" y "De la Rosa"), cultivados en Aniñón (Zaragoza) a 900 m sobre el nivel del mar, no polinizados (NP) o con tubos polínicos en el estigma (STG), estilo (STL), ovario (OVR) y óvulo (OVL).

Percentage of pistils of two varieties of cherry ("Monzón" and "De la Rosa"), cultivated in Aniñón (Zaragoza) at 900 m on the sea level, not pollinated (NP) or with pollen tubes present in the stigma (STG), stile (STL), ovary (OVR) and ovule (OVL).

el porcentaje de fecundación en la parcela 2 fue superior al de la 1 sino que también se observa un incremento considerable en el porcentaje de pistilos con óvulos fecundados. Esta situación puede explicarse teniendo en cuenta la cantidad de flores no fecundadas que fueron cayendo en el transcurso del tiempo, que pudo ser mayor que en la parcela 1.

El 5 de Abril de 1994 el porcentaje de fecundación del cultivar "Monzón" situado en la parcela 1, en términos absolutos fue mayor que el del cultivar "De la Rosa" plantado en la misma parcela (Fig. 3); sin embargo, estas diferencias no resultaron significativas al nivel de significación del 5 %.

Al comparar los porcentajes de fecundación alcanzados, dentro de una misma parcela y cultivar, entre los estados fenológicos H y J (FLECKINGER, 1945), se observa que cuando en una misma fecha coexisten dos estados fenológicos, normalmente, las muestras pertenecientes al estado fenológico menos avanzado no están fecundadas (Fig. 4).

Confirmandose de esta forma el hecho de que la fecundación se produce pocos días despues de la antesis. Los pistilos no fecundados pueden continuar inicialmente su desarrollo aunque a un ritmo más lento que los fecundados.

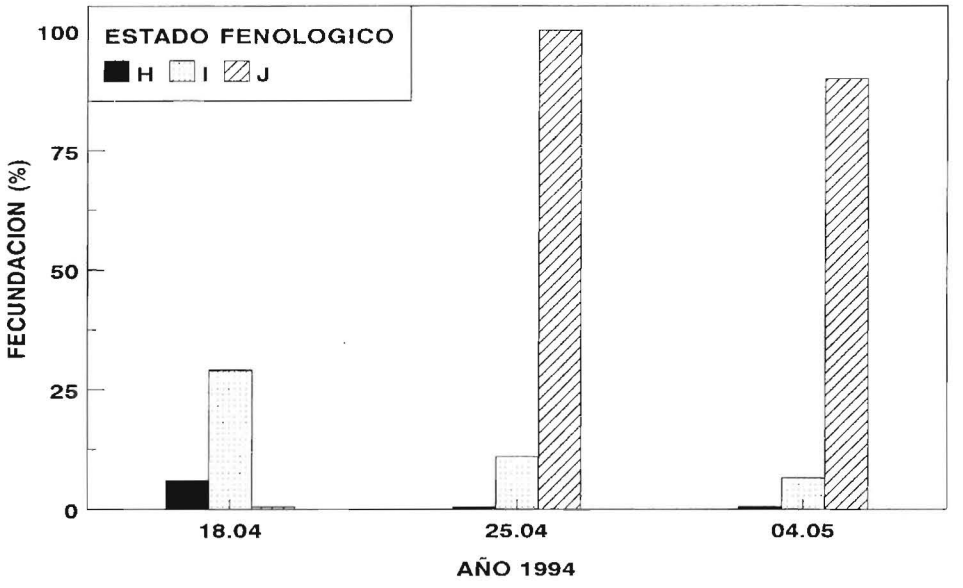


Fig. 4. Evolución de la fecundación del cultivar de cerezo "Monzón", cultivado en Aniñón (Zaragoza) a 750 m sobre el nivel del mar, en función del tiempo y del estado fenológico (H, I, J), según FLECKINGER (1945).

Evolution of the fertilization of cherry "Monzón", cultivated in Aniñón (Zaragoza) at 750 m on the sea level, according to the date of sampling and phenological stage (H, I and J) according FLECKINGER (1945).

En las fechas en las que la toma de muestras coincidió en ambas parcelas, el nivel de daños en el pistilo fue mayor en la parcela 1, situada a mayor altitud (Fig. 5). Las lesiones observadas consistieron en una deshidratación y rotura de los tejidos producidas por la formación de hielo, donde se registraron las temperaturas más bajas, llegándose inclusoa –6 °C (Fig. 1). La deshidratación que el hielo produjo en el tejido presentó una distribución radial, similar a la de las roturas. En ocasiones también se observaron zonas en las que a lo largo de una línea se alternaron una deshidratación muy intensa y la rotura del tejido. Esta deshidratación se diferencia de las debidas a la degeneración de los tejidos muertos, por presentar, estas últimas, una distribución concéntrica alrededor de los haces vasculares, dando al tejido el aspecto de estar cubierto por una retícula.

Los daños en el pistilo pueden deberse tanto a las temperaturas bajo cero registradas entre los días 13 y 14 de Abril (Fig. 1) como a una deficiente fecundación. En aquellos casos en los que el porcentaje de fecundación fue bajo y no hubo daños por helada, el nivel de daños en los óvulos fue bastante elevado e inversamente proporcional al tamaño del fruto (Fig. 5). De estas consideraciones se deduce que tras la falta de fecundación, el crecimiento del fruto se detiene en un momento determinado y los daños en el ovario y óvulo se manifiestan antes en aquellos que detuvieron primero su crecimiento.

Los daños por falta de fecundación se manifestaron antes en el óvulo que en el ovario y se hicieron patentes por la aparición de un pardeamiento previo a la aparición de los primeros síntomas de deshidratación en el ovario. En estas situaciones el tamaño del óvulo es inferior al que correspondería al del ovario, en caso de que se hubiera producido la fecundación.

Después de producirse la helada, los niveles de daños observados en ovario y óvulo se aproximaron, lo que indica que una gran diferencia entre los daños del ovario y del óvulo puede ser debida a la falta de fecundación.

Las conclusiones de este trabajo son:

1. En el cultivar "Monzón" no existieron diferencias significativas entre la fecundación observada en las parcelas 1 y 2, indicándonos que entre 750 y 900 m de altitud sobre el nivel del mar la fecundación fue similar, lo que sugiere que, cuando existen condiciones favorables para la polinización, la altitud no representa en sí misma ningún factor limitante para la fecundación del cultivar de cerezo "Monzon".

2. A una altitud de 900 m y con temperaturas mínimas comprendidas entre 2 y 7 °C, la fecundación de los cultivares "Monzón" y "De la Rosa" fue similar.

3. Cuando en una fecha determinada y para una misma parcela y variedad coexisten dos estados fenológicos comprendidos entre H y J, los pistilos pertenecientes al estado fenológico menos avanzado generalmente no están fecundados.

4. Por debajo de 0 °C, el daño que se produjo en los tejidos del fruto de cerezo fue sensiblemente mayor cuando, por dos días consecutivos, las temperaturas mínimas estuvieron comprendidas entre 0 y –3 °C (primer día) y 0 y –6 °C (segundo día), durante 8 h/día (parcela 1), que cuando la permanencia bajo cero fue de 4 h/día y las temperaturas oscilaron entre 0 y –2.0 °C y entre 0 y –2.5 °C (parcela 2). De lo que deducimos que para que una helada produzca perdidas del 100 % de la cosecha serían

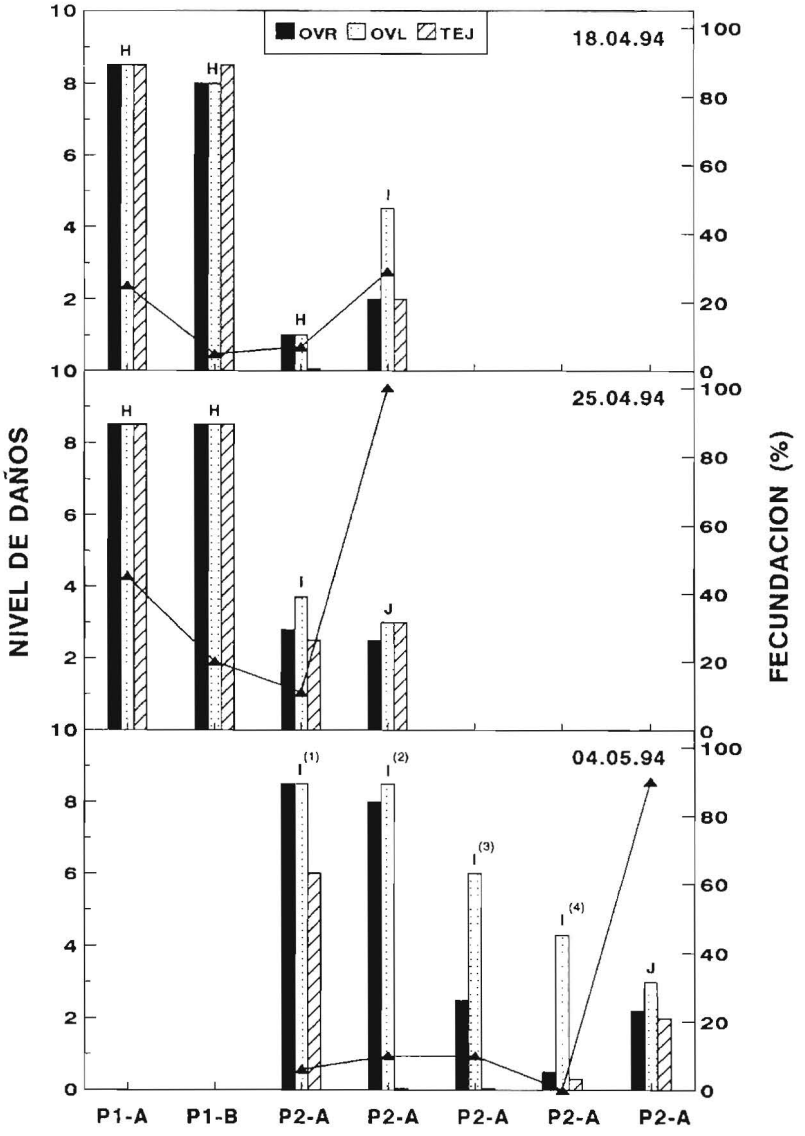


Fig. 5. Nivel de daños (clasificados según el Cuadro 2) en el ovario (OVR), en el óvulo (OVL) y en los tejidos (TEJ) y porcentaje de fecundación (▲) de dos cultivares de cerezo ["Monzón" (A) y "De la Rosa" (B)] en función de la altitud sobre el nivel del mar (P1, 900 m y P2, 750 m), del estado fenológico (H, I, J) según FLECKINGER (1945) y del tamaño del ovario (mm): 6x3 (1), 8x4 (2), 10x5 (3) y 11x7 (4).

Damage intensity (according to Table 2) in the ovary (OVR), ovule (OVL) and tissues (TEJ) and percentage of fertilization (▲) of the varieties "Monzón" (A) and "De la Rosa" (B) cultivated at different altitude on the sea level (P1, 900 m and P2, 750 m), phenological stage (H, I and J) according to FLECKINGER (1945) and ovary size (mm): 6x3 (1), 8x4 (2), 10x5 (3) and 11x7 (4).

precisas temperaturas inferiores a – 2.5 °C y/o tiempos de exposición más largos.

Agradecimientos:

A Dña. Cruz Vallés por la labor que desarrolló durante la recolección del material y a Dña. Ana Amalia Molina por su eficaz colaboración en la realización de este trabajo.

Bibliografía

ARBELOA, A; HERRERO, M. 1987. Germinación y difusión de proteinas del polen del melocotonero. ITEA: *Producción Vegetal,* 69, 47–53.

FLECKINGER, J. 1945. Notations phénologiques et représentations graphiques du development des bourgeons de poirier. *Comptes Rendus Congres Association Française Avancé Sciences,* Paris.

GUERRERO-PRIETO, V.M.; VASILAKAKIS, M.D.; LOMBARD, P.B. 1985. Factors controlling fruit set of "Napoleon" sweet cherry in Western Oregon. *HortScience,* 20, 913–914.

HERRERO, M.; ARBELOA, A. 1989. Influence of the pistil on pollen tube kinetics in peach *(Prunus persica). American Journal of Botany,* 76, 1441–1447.

KHO, Y.O.; BAËR, J. 1968. Observing pollen tubes by means of fluorescence. *Euphytica,* 17, 298–302.

KRILOVA, V.V. 1989. Embryological evaluation of self fertility in apple. *Tagungsbericht, Akademie der Landwirtschaftswissenschaften der Deutchen Demokratischen Republik,* 174, 49–54.

KUEHN, B.F. 1988. Examination of reasons for poor fruit set in the sour cherry cultivar "Stevnsbaer" by means of fluorescence microscopy. *Tidsskrift for Planteavl,* 92, 169– 174.

LICHOU, J.; EDIN, M.; TRONEL, C.; SAUNIER, R. 1990. Le cerisier: "La Cerise de Table". CTIFL, Paris, 361 p.

MAPA, 1995. Anuario de Estadística Agraria. Anuario: 1993. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, Madrid, p. 322.

MARTIN, F.W. 1958. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Technology,* 34, 125–129.

MODLIBOWSKA, I. 1961. Sur les mecanismes du gel et de la reprise d'une vie normale au retour a la temperature ordinaire. *Bulletin de la Société Française de Physiologie Végétale.* 7, 123–133.

NERI, D.; FILITI, N. 1989. Capacitá di recupero delle gemme miste di pero danneggiate dal freddo. *Rivista di Frutticoltura 2,* 37–40.

SAUNIER, R.; FOS, E.; TAUZIN, Y. 1989. La pollination des cerises douces *(Prunus avium). L'Arboriculture Fruitiére,* 416, 64–68.

STÖSSER, R.; ANVARI, S.F. 1983. Pollen tube growth and fruit set as influenced by senescence of stigma, style and ovules. *Acta Horticulturae,* 139, 13–22.

VASILAKAKIS, M.; PORLINGIS, I.C. 1985. Effect of temperature on pollen germination, pollen tube growth, effective pollination period, and fruit set of pear. *HortScience,* 20, 733–735.

ZAR, J.H. 1984. Biostatistical Analysis. Prentice–Hall, New Jersey, pp. 306–327.

(Aceptado para publicación el 6 de septiembre de 1996)