



ARTÍCULO ORIGINAL

CUBA & CAÑA



URL: <http://www.cuba-cane.inica.azcuba.cu> E-mail: journal.cuba.cane@gmail.com

CU-ID: 2258/v24n2e04

CARACTERIZACIÓN FITOPATOLÓGICA, HISTOLÓGICA Y MOLECULAR DE LA INTERACCIÓN *GLUCONACETOBACTER DIAZOTROPHICUS*-*XANTHOMONAS ALBILINEANS*-CAÑA DE AZÚCAR

PHYTOPATHOLOGIC, HISTOLOGIC AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF THE INTERACTION *GLUCONACETOBACTER DIAZOTROPHICUS*-*XANTHOMONAS ALBILINEANS*-SUGARCANE

MARIO CASAS-GONZÁLEZ^{1*}, RICARDO ACEVEDO-ROJAS¹, JUANA PÉREZ-PÉREZ¹, DIAGNE CASAÑAS-CASTILLO¹, YADIRA ROSA MEUNIER-CARMENATE¹, JAVIER ALEJANDRO MARTÍNEZ-SEOANE¹, MARTA EUGENIA ARIAS¹, MARÍA CATALINA LUQUE², YAQUELÍN PUCHADES-IZAGUIRRE¹, YENIMA PELLÓN-GUZMÁN¹, MERCEDES DELGADO-BETANCOURT¹, OMELIO CARVAJAL-JAIME¹, MARÍA LA O-HECHAVARRÍA¹

¹Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA), Boyeros, La Habana, Cuba.

²Universidad Nacional de Tucumán, Facultad de Ciencias Naturales, San Miguel de Tucumán, Argentina.

*Autor para correspondencia: Mario Casas-González, e-mail: mario.casas@inica.azcuba.cu

Palabras clave:	RESUMEN
interacción endófito-planta-pathogeno	La búsqueda de resistencia a enfermedades por diferentes vías reviste especial importancia en las estrategias de manejo para una agricultura cañera sostenible. En este sentido se ha informado, en estudios <i>in vitro</i> , el potencial de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> (Gd) como antagonista de <i>Xanthomonas albilineans</i> (Xa). El objetivo de este trabajo fue caracterizar fitopatológica, histológica y molecularmente la interacción endófito-caña de azúcar-patógeno. Se emplearon los cultivares C1051-73 y C90-469, con cuatro tratamientos: control sano, plantas inoculadas con Xa, plantas inoculadas con Gd y plantas inoculadas con Gd y Xa. Se realizaron muestreos mensuales y se registró el número de plantas con síntomas por tratamiento y réplica de cada cultivar hasta los cuatro meses posteriores a la inoculación. La presencia de Xa y Gd se detectó por PCR específico y los cambios histológicos con cortes transversales. Se demostró la patogenicidad <i>X. albilineans</i> , así como la efectividad de la inoculación, por el desarrollo de síntomas típicos de escaldadura foliar de la caña de azúcar, en el control de infección del cultivar susceptible C1051-73. En el resto de los tratamientos no se detectó Xa, lo que coincide con la acumulación de una sustancia refringente en las células del parénquima que rodean los haces vasculares. Se observó la disminución de la intensidad del fragmento de ADN específico de Xa amplificado por PCR, ya que la acción de Gd sobre Xa puede haber ocasionado que la bacteria no pudiera establecerse en la planta.
Keywords:	ABSTRACT
Endophyte-Plant-Pathogen Interaction	Searching for resistance to diseases by different methods is of special importance regarding strategies to reach a sustainable sugarcane agriculture. <i>In vitro</i> studies in this sense have reported the potential of the bacterium <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> (Gd) as antagonist of <i>Xanthomonas albilineans</i> (Xa), bacterium that causes leaf scald in sugarcane. The aim of this work was the phytopathologic, histologic and molecular characterization of the endophyte-sugarcane-pathogen interaction. To reach this objective, cultivars C1051-73 and C90-469 were selected with four treatments: healthy control, Xa inoculation, Gd inoculation and Gd+Xa inoculation. Samples were taken monthly and the number of plants of each cultivar showing symptoms per treatments and replicates was registered up to four months after inoculations. The presence of each bacterium was detected by specific PCR and the histologic changes by means of transversal cuts. The pathogenicity of Xa and the effectiveness of the inoculations was demonstrated by leaf scald typical symptoms development in the susceptible control cultivar C1051-73. In the rest of treatments Xa was not detected which coincide with the accumulation of a refracting substance in the parenchymatic cells surrounding the vascular vessels. The action of Gd over Xa may have been the cause that Xa could not be settled which is in agreement with the intensity decrease of the DNA specific fragment amplified by PCR.

Recibido: 10 de marzo de 2021

Aceptado: 13 de noviembre de 2021

Este artículo se encuentra bajo los términos de la licencia Creative Commons Attribution License CCBY-NC (4.0) internacional.



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

INTRODUCCIÓN

Los endófitos son un grupo específico de microorganismos que viven sin causar daño en el interior de células o tejidos de plantas superiores. Dentro de este grupo se destacan las bacterias, que pueden ayudar a controlar ataques de patógenos, insectos y nematodos, debido a que identifican la presencia de estos organismos en la planta de una manera rápida y ayudan en el desencadenamiento del fenómeno de inducción del sistema de resistencia sistémica (Kloepper & Ryu, 2006).

Las bacterias endófitas pueden ayudar a las semillas a germinar e incrementar el crecimiento de vitroplantas. Todo esto es posible por la capacidad de las bacterias de sintetizar sustancias metabólicas como antibióticos y fungicidas, así como otros metabolitos secundarios que incluyen antivirales y agentes inmunosupresores (Sánchez *et al.*, 2018).

Gluconacetobacter diazotrophicus (Gd) es un endófito bacteriano natural en caña de azúcar y otros cultivos de importancia económica (Arencibia *et al.*, 2006). Aparte de ser un microorganismo fijador de nitrógeno atmosférico y producir fitohormonas, ha sido informado su potencial como control biológico de importantes agentes patógenos, entre ellos la bacteria *Xanthomonas albilineans* (Xa), agente causal de la escaldadura foliar, una de las enfermedades de mayor importancia a nivel mundial en las áreas de agricultura cañera (Piñón *et al.*, 2002).

La búsqueda de resistencia a enfermedades por diferentes vías es un criterio primario para la selección de variedades, este aspecto reviste especial importancia en las estrategias de manejo para la agricultura cañera sostenible. El objetivo de este trabajo fue caracterizar fitopatológica, histológica y molecularmente la interacción endófito-caña de azúcar-patógeno.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tratamientos

Se seleccionaron vitroplantas de los cultivares con reacción de resistencia contrastante a la enfermedad escaldadura foliar: C1051-73 (susceptible) y C90-469 (resistente), los que se encontraban en bandejas en fase de adaptación a término (45 días) en la biofábrica de caña de azúcar del INICA localizada en Villa Clara. Las plantas se llevaron a vivero en la Estación Experimental de Jovellanos. La distancia entre cada una fue de 50cm a modo de evitar sobrepoblación y competencia.

Se plantaron cinco surcos de cada variedad con cuatro réplicas, cada uno con diez plantas por tratamiento: 1) control sano, 2) inoculadas con Xa, 3) inoculadas con Gd y 4) inoculadas con Gd y Xa. A los dos primeros se les aplicó agua destilada a punto de goteo al momento de la plantación.

Posteriormente todas las plantas se mantuvieron con riego días alternos hasta los cuatro meses.

Inóculos bacterianos

El inóculo de la cepa 166-I de Gd se obtuvo, mediante la multiplicación por 24 horas en medio Papa-P líquido (Cavalcante & Dobereiner, 1988). La concentración obtenida fue de 2×10^8 ufc·mL⁻¹. La inoculación de las plantas se realizó, mediante punción de la zona de crecimiento apical con aguja de jeringuilla de 1mL de capacidad. Posteriormente, la suspensión se asperjó por toda el área foliar hasta punto de goteo. Quince días después se realizó la inoculación de la bacteria patógena *X. albilineans*, por el método de decapitación, en los tratamientos dos y cuatro. Se empleó la cepa 74-Xa a una concentración de 3×10^8 ufc·mL⁻¹. El inóculo se obtuvo por la multiplicación de la bacteria en medio Wilbrink modificado líquido con agitación constante por 72 h (Rott *et al.*, 1995).

Evaluaciones realizadas

Se realizaron muestreos mensuales y se registró el número de plantas con síntomas por tratamiento y réplica de cada cultivar. A los cuatro meses posteriores a la inoculación, se determinó el porcentaje de infección (PI) como: $PI = \# \text{ de plantas infectadas} / \# \text{ total de plantas} \times 100$ (Jorge *et al.*, 2011). La respuesta de los cultivares a los tratamientos se calculó de acuerdo a la escala propuesta por González *et al.* (2010). Además, se midieron la altura, diámetro y peso fresco de la parte aérea de 20 plantas de cada tratamiento. Para la comparación de las medias se aplicó la alternativa no paramétrica del análisis de varianza, la prueba Kruskal-Wallis y entre parejas de grupos se utilizó la prueba de Mann-Whitney.

Análisis de PCR

Se tomaron muestras de los tercios basales de cinco hojas+3 de cada tratamiento y se consideraron como muestra única. Se conservaron a -20°C para la extracción de los ácidos nucleicos totales.

El ADN total se extrajo con el Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega), los que se suspendieron en agua bidestilada estéril y su calidad se monitoreó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%. Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*) se emplearon cebadores específicos para cada bacteria.

Para la detección de *G. diazotrophicus* se utilizaron cebadores que amplifican el gen 23S ADN-ribosomal: 1440/F 5'-GTTGGCTTAGAAGCAGCC-3' y AD/R 5'-TGCGGCAAAAGCCGAT-3', que generan un producto de 411pb. Se realizó en un termociclador PTC100 (MJ Research, USA), con el siguiente programa de reacción: un ciclo a 94°C por 3 min; 40 ciclos a 94°C por 30 s, 56°C por 30 s y 72°C por 1min y un ciclo final a 72°C por 5 min (Kirchhof *et al.*, 1998).

Para la detección de *X. albilineans* se utilizaron los cebadores PGBL1: CTTTGGGTCTGTAGCTCAGG y PGBL2: GCCTCAAGGTCATATTCAGC que amplifican un producto de 288pb. La misma se llevó a cabo en un termociclador PTC100 (MJ Research, USA), con el siguiente programa de reacción: un ciclo a 95°C por 5 min; 40 ciclos a 94°C por 10 s, 57°C por 10 s y 72°C por 30s y un ciclo final a 72°C por 2 min.

Los productos amplificados se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, seguido de la tinción en GelRed™ 0,001% (Biotium, EE. UU.) y visualización bajo luz U.V.

Análisis Histológicos

Secciones de los tercios medios de las plantas de cada tratamiento de 1,0 cm² se fijaron en FAA (5 mL de Formaldehído, 5ml de ácido acético, 90 mL de etanol al 70%) para los análisis histológicos.

Se realizaron cortes transversales de la lámina de la hoja a mano alzada con el auxilio de cuchilla, según la técnica de Dizeo de Strittmater D'Ambrogio de Argüeso (1986). Los fragmentos con un grosor de 12 a 14 µm se clarificaron mediante lavados sucesivos en una solución de hipoclorito de sodio al 0,5% (v/v).

Se utilizó azul de cresilo (3 µg·mL⁻¹) para determinar la presencia de celulosa en las paredes primarias y el citoplasma según Perez & Tomasi (2002), así como la presencia de lignina con safranina-verde rápido (3 µg·mL⁻¹). Se realizaron preparaciones semipermanentes en portaobjetos con agua-glicerina 1:1 (v/v) según Debes (2013) y se observaron en microscopio óptico (Leica DM 500, Alemania) y fotografiadas con cámara digital Sony DSC-W55 (Japón).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se demostró la patogenicidad del aislamiento bacteriano de *X. albilineans*, así como la efectividad de la inoculación, por el desarrollo de síntomas típicos de escaldadura foliar de la caña de azúcar. Esto se evidenció en las plantas con-

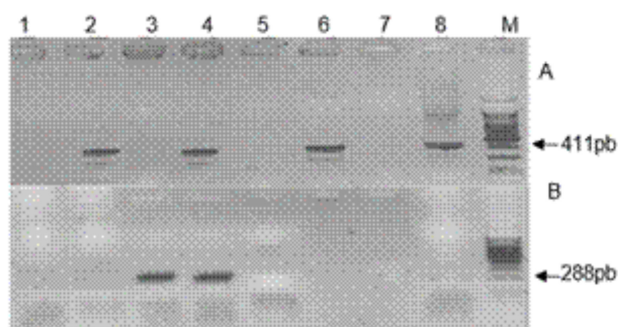


Figura 1. Fragmentos amplificados por PCR específicos. A: *G. diazotrophicus* y B: *X. albilineans*. A los quince días posteriores a la inoculación, en el cultivar susceptible a escaldadura foliar C1051-73 (S, líneas 1-4) y resistente, C90-469 (R, 5-8). Con los tratamientos: Control sano (1 y 5), 2), control Gd (2 y 6), control de infección Xa (3 y 7) y Gd + Xa (4 y 8). M: 100bp DNA Ladder (Promega),

troles de infección Xa, en el cultivar susceptible C1051-73, a partir de los quince días posteriores a la inoculación hasta su muerte, por lo que este tratamiento no se tuvo en cuenta para el análisis estadístico, a los cuatro meses postinoculación (Tabla 1).

Los resultados indican que con la aplicación de *G. diazotrophicus* se logra protección de las plantas susceptibles, sin variar los parámetros morfológicos de las mismas por inducir el efecto de resistencia sistémica adquirida.

Se confirmó la ausencia de ambas bacterias en los controles sanos mediante la reacción en cadena de la polimerasa. También, la presencia de *G. diazotrophicus*, en los tratamientos inoculados con este endófito (Figura 1A) que corroboran los resultados de la detección histoquímica. En el caso de *X. albilineans* (Figura 1B), se amplificó un producto con la talla esperada (288pb) en los controles de infección del cultivar susceptible. En tanto en los tratamientos que presentaban Gd, disminuyó su intensidad a partir de los quince días de inoculadas las plantas y en el cultivar resistente. Esto concuerda con los resultados de los chequeos

Tabla 1. Efecto de la inoculación de *G. diazotrophicus* y *X. albilineans* sobre las variables altura, diámetro del tallo y peso fresco de la parte aérea de las plantas en los cultivares de caña de azúcar C1051-73 y C90-469

Factores de variación	Grados Libertad	Altura		Diámetro		Peso fresco	
		SC		SC		SC	
Repeticiones	5	98,71	ns	0,19500	ns	1699,97	ns
Variedad (Var)	1	704,17		0,73500	**	8694,43	**
Tratamiento (Tto)	1	13,50	ns	0,10667	ns	351,14	ns
Var*Tto	1	24,00	ns	0,01500	ns	786,61	ns
Error	20	555.67		0.56333		6730.12	

SC: Suma de cuadrados, **: significación estadística para $p \leq 0.05$, ns: no significativo.

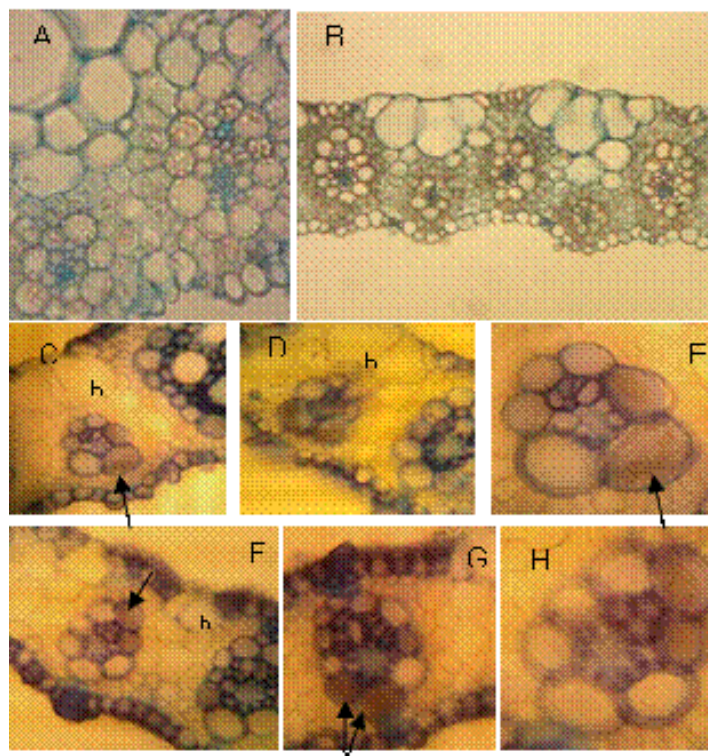


Figura 2. Anatomía foliar del cultivar C1051-73, a través de cortes transversales de la lámina de la hoja, 30 días posteriores a la inoculación. Se utilizaron los tratamientos: 1, control sano (A, B). 2, Control Gd (C, D, E) y 4, plantas inoculadas con Gd+Xa (F, G, H). Las plantas controles de infección Xa (tratamiento 3), no se analizaron porque estaban muertas al final del experimento. Las flechas indican inclusiones presentes en las células de la vaina de haces menores que se ubican a la altura de las células buliformes (bul).

fitopatológicos hasta la última evaluación realizada, a los cuatro meses postinoculación.

En los cortes transversales de la lámina de hojas de los controles sanos del cultivar C1051-73 no se observan inclusiones citoplasmáticas en las células del parénquima, alrededor de los haces vasculares (Figura 2A, B). Sin embargo, a los 30 días posteriores a la inoculación del endófito *G. diazotrophicus* (tratamiento 2: control Gd) aparecen sustancias de aspecto refringente (Figura 2C, D, E), que se incrementan en las plantas con el tratamiento Gd+Xa (Figura 2F, G, H).

La acción de Gd sugiere que el patógeno no haya podido establecerse, lo que concuerda con los resultados de los análisis fitopatológicos con ausencia de síntomas de la enfermedad en el cultivar susceptible y la disminución de la intensidad del fragmento de ADN específico amplificado por PCR.

En cuanto a los sitios que coloniza Gd y su distribución en el interior de la planta de caña de azúcar aún no se han esclarecido. Se ha demostrado que coloniza los espacios intercelulares de la raíz y los vasos del xilema (Loiret *et al.*, 2004).

Por otra parte, autores como Compant *et al.* (2010), plantean que el control biológico de bacterias y hongos patógenos por parte de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal se lleva a cabo por competencia (de espacio, nutrientes, agua, luz, oxígeno) o mediante interacciones amensalistas como la producción de antibióticos o toxinas específicas como las bacteriocinas.

Se demostró que en el cultivar susceptible perduran hasta los cuatro meses los efectos de Gd como protector de la infección a escaldadura foliar, lo cual corroboró los resultados de Arencibia *et al.* (2006) sobre la inducción diferencial de respuesta adquirida por las plantas en etapas tempranas de la interacción. Este aspecto abre nuevas oportunidades para el control de la enfermedad en áreas comerciales del cultivo.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en los diferentes niveles estudiados de la interacción Xa/Gd/caña de azúcar evidencian la adquisición de resistencia sistémica ante el patógeno Xa en el cultivar susceptible C1051-73, el cual no desarrolló síntomas de escaldadura foliar durante el periodo de estudio de cuatro meses abarcado por el trabajo

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arencibia, A., Estevez, Y., Vinagre, F., Bernal, A., Perez, J., Carmona, E., Hemerly, A., & Santana, I. (2006). Induced-resistance in sugarcane against pathogenic bacteria *Xanthomonas albilineans* mediated by an endophytic interaction. *Sugar Tech*, 8(4), 272-280, ISSN: 0974-0740.
- Cavalcante, V. A., & Dobereiner, J. (1988). A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and soil*, 108(1), 23-31, ISSN: 1573-5036.
- Compant, S., Clément, C., & Sessitsch, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo-and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(5), 669-678, ISSN: 0038-0717.
- D'Ambrogio de Argüeso, A. (1986). *Manual de técnicas en histología vegetal*. Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina.
- Debes, M. A. (2013). *Mejoramiento vegetal de frutillas (Fragaria x ananassa) a partir de germoplasma silvestre relacionado* [Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Biológicas]. Universidad Nacional de Tucumán (UNT), Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo (INSIBIO-CONICET), Tucumán, Argentina.
- González, R., Carvajal, O., Tamayo, M., Montalván, J., García, J. H., Pérez, J. R., Jorge, H., Mesa, J. M., Puchades, Y., & Barroso, G. (2010). Método de evaluación de la resistencia a la escaldadura foliar de la caña de azúcar en Cuba. *Revista Cuba & Caña*, 1, 27-35, ISSN: 1028-6527.
- Jorge, H., Jorge, I. M., Mesa, J., & Bernal, N. (2011). *Normas y Procedimientos del Programa de Fitomejoramiento de la Caña de Azúcar en Cuba* [Ediciones PUBLINICA, La Habana, Cuba, pp. 308-346.].
- Kirchhof, G., Baldani, J. I., Reis, V. M., & Hartmann, A. (1998). Molecular assay to identify *Acetobacter diazotrophicus* and detect its occurrence in plant tissues. *Canadian Journal of Microbiology*, 44(1), 12-19, ISSN: 0008-4166.
- Kloepper, J. W., & Ryu, C.-M. (2006). *Bacterial endophytes as elicitors of induced systemic resistance* (Schulz BJE, Boyle CJC&Sieber TN). Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Loiret, F. G., Ortega, E., Ortega, R. P., Rodés, R., & De la Fuente, E. (2004). *Gluconacetobacter diazotrophicus* es todavía un dilema para la ciencia. *Revista Biología*, 18(2), 113-122.
- Perez, A. N., & Tomasi, V. H. (2002). Tinción con azul brillante de cresilo en secciones vegetales con parafina. *Bol. Soc. Argentina Botánica*, 37, 211-215, ISSN: 0373-580X.
- Piñón, D., Casas, M., Blanch, M., Fontaniella, B., Blanco, Y., Vicente, C., Solas, M. T., & Legaz, M. E. (2002). *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a sugar cane endosymbiont, produces a bacteriocin against *Xanthomonas albilineans*, a sugar cane pathogen. *Research in Microbiology*, 153(6), 345-351, ISSN: 0923-2508.
- Rott, P., Soupa, D., Brunet, Y., Feldmann, P., & Letourmy, P. (1995). Leaf scald (*Xanthomonas albilineans*) incidence and its effect on yield in seven sugarcane cultivars in Guadeloupe. *Plant pathology*, 44(6), 1075-1084, ISSN: 0032-0862.
- Sánchez, B. A., León, G. de A. D., Aranda, O. S., Zavaleta, M. E., Nava, D. C., Goodwin, P. H., & Leyva, M. G. (2018). Bacterias endófitas de la raíz en líneas de maíces tolerantes y susceptibles a sequía. *Revista mexicana de fitopatología*, 36(1), 35-55, ISSN: 0185-3309, DOI: <https://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1710-3>

Mario Casas-González, Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA), Carretera CUJAE km 2 ½ Boyeros, La Habana, Cuba. e-mail: mario.casas@inica.azcuba.cu

Ricardo Acevedo-Rojas, Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA), Carretera CUJAE km 2 ½ Boyeros, La Habana, Cuba. e-mail: mario.casas@inica.azcuba.cu

Juana Pérez-Pérez, Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA), Carretera CUJAE km 2 ½ Boyeros, La Habana, Cuba. e-mail: mario.casas@inica.azcuba.cu

Diagne Casañas-Castillo, Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA), Carretera CUJAE km 2 ½ Boyeros, La Habana, Cuba. e-mail: mario.casas@inica.azcuba.cu

Yadira Rosa Meunier-Carmenate, Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA), Carretera CUJAE km 2 ½ Boyeros, La Habana, Cuba. e-mail: mario.casas@inica.azcuba.cu

Javier Alejandro Martínez-Seoane, Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA), Carretera CUJAE km 2 ½ Boyeros, La Habana, Cuba. e-mail: mario.casas@inica.azcuba.cu

Marta Eugenia Arias, Universidad Nacional de Tucumán, Facultad de ciencias Naturales. Instituto Miguel Lillo, 205. San miguel de Tucumán, Argentina, e-mail: mario.casas@inica.azcuba.cu

Maria Catalina Luque, Universidad Nacional de Tucumán, Facultad de ciencias Naturales. Instituto Miguel Lillo, 205. San miguel de Tucumán, Argentina, e-mail: mario.casas@inica.azcuba.cu

Yaquelín Puchades-Izaguirre, Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA), Carretera CUJAE km 2 ½ Boyeros, La Habana, Cuba. e-mail: mario.casas@inica.azcuba.cu

Yenima Pellón-Guzmán, Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA), Carretera CUJAE km 2 ½ Boyeros, La Habana, Cuba. e-mail: mario.casas@inica.azcuba.cu

Mercedes Delgado-Betancourt, Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA), Carretera CUJAE km 2 ½ Boyeros, La Habana, Cuba. e-mail: mario.casas@inica.azcuba.cu

Omelio Carvajal-Jaime, Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA), Carretera CUJAE km 2 ½ Boyeros, La Habana, Cuba. e-mail: mario.casas@inica.azcuba.cu

Maria La O-Hechavarría, Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA), Carretera CUJAE km 2 ½ Boyeros, La Habana, Cuba. e-mail: mario.casas@inica.azcuba.cu

Los autores de este trabajo declaran no presentar conflicto de intereses.