

Control del Virus de la Hoja Amarilla de la Caña de Azúcar (SCYLV) Mediante Técnicas de Cultivo de Tejidos en la Variedad CR74-250

C. Burbano¹, F. Garcés²

¹Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL)
Campus Gustavo Galindo, Km 30.5 vía Perimetral
Apartado 09-01-5863. Guayaquil-Ecuador

²Centro de Investigaciones de la Caña de azúcar del Ecuador (CINCAE)
Departamento de Fitopatología
Estación Experimental: Km 49,6 Vía Durán – Tambo
Casilla Letra “S” Guayaquil-Ecuador
rburbano@espol.edu.ec¹, fgarcés@cincae.org²

Resumen

El presente trabajo presenta alternativas para el manejo del virus de la hoja amarilla de la caña de azúcar (SCYLV) mediante la aplicación de herramientas de cultivo de tejidos para la obtención de semilla sana libres del virus utilizando explantes de la variedad CR74-250. Para el efecto se planteó la extracción de meristemos, la inducción de callos embriogénicos y la utilización de Ribavirín (Virazole) (30 mg.l⁻¹), el cual tiene actividad antiviral; así como el uso del ácido salicílico, AS (100µM), que actúa como elicitador en las respuestas de Resistencia Sistémica Adquirida (SAR). Adicionalmente a los tratamientos in vitro, se utilizaron los controles de termoterapia (41°C, 15 días) y agua caliente (51°C, 1 hora). Se registraron las variables de número de brotes por explante, fenolización y presencia o ausencia del virus. El diagnóstico viral se lo efectuó mediante la técnica inmunoenzimática Tissue Blot Immunoassay (TBIA). Los explantes sometidos a la inducción de callos embriogénicos mostró el menor grado de fenolización (0.32) comparado a los obtenidos en los meristemos (1.93); mientras que no hubo diferencias significativas en cuanto al número de brotes por explante. La menor incidencia del virus fue observada en las plantas tratadas con el inductor AS y en los explantes sometidos a la inducción de callos embriogénicos (5.0%); no obstante, presentaron el mismo nivel de significancia con la extracción de meristemos y la aplicación de Virazole, (6.7%); mientras que los tratamientos sometidos a termoterapia y agua caliente mostraron los niveles más altos de incidencia (86.7 y 90.0%).

Palabras clave: Elicitor, Termoterapia, Ácido Salicílico, Resistencia Sistémica Adquirida.

Abstract

The present work show alternatives for the management of the Sugarcane Yellow Leaf Virus (SCYLV) by using tissue culture techniques for the obtaining of virus free healthy seed using explants of the variety CR74-250. For the effect the extraction was presented of meristemos, the induction of embriogenics callus and the utilization of Ribavirín (Virazole) (30 mg.l⁻¹), which has antiviral activity; as well as the use of the salicylic acid (SA) (100µM), that acts as elicitador in the answers of Systemic Acquired Resistance (SAR). Additionally to the processing in vitro, the controls were utilized of thermotherapy (41°C, 15 days) and hot water (51°C, 1 hour). The bud number variables were registered by explante, fenolización and presence or absence of the virus. The viral diagnosis was performed it by means of the technical one inmunoenzimatic Tissue Blot Immunoassay (TBIA). The explants submitted to the induction of tripe embriogénicos showed the smaller degree of fenolización (0.32) compared with the obtained in meristemos culture (1.93); while do not there was differentiate significant as soon as al number of bud by explant. The smaller incident of the virus was observed in the plants treated with the inductor SA and in the explants submitted to the induction of embriogenics callus (5.0%); nevertheless, they presented the same level of significancia with the extraction of meristems and the application of Virazole (6.7%); while the processing submitted to thermotherapy and hot water showed the highest levels of incident (86.7 y 90.0%).

Key words: Elicitor, Thermotherapy, Salicylic Acid, Systemic Acquired Resistance.

1. Introducción

El virus del síndrome de la hoja amarilla (Sugarcane Yellow Leaf Virus, SCYLV) de la caña de azúcar fue detectado por primera vez en Montpellier, Francia [4], asociándolo con pérdidas en el rendimiento, tanto en el rendimiento azucarero como en tonelaje de caña cosechada [6] y [18].

El virus de la hoja amarilla posee ARN como material genético y está confinado al floema del huésped y taxonómicamente es un miembro de la familia Luteoviridae, aunque su ubicación dentro de esta familia no ha sido completamente determinada [6].

En la actualidad está ampliamente distribuido en todo el mundo y en el Ecuador constituye un problema epidemiológico [10]; encontrándose incidencias promedio de 26.31% en los tres ingenios y con máximos niveles hasta del 99.3 % de infección y se ha encontrado distribuido en el 73.82% de los canteros evaluados [9].

Sheffield, (1942) y Laghans et al., (1977) citado por Ortega [8] informan que aunque los meristemas apicales son a menudo libre de virus, esto no puede ser contemplado como un fenómeno de ocurrencia universal. Existe suficiente evidencia para sugerir que algunos virus actualmente invaden la región meristemática de los ápices en crecimiento. Algunos de los virus conocidos por invadir la región meristemática de los ápices de los brotes son el TMV, virus X de la papa (Mori 1977), y el CMV (Walkey y Cooper, 1972) [8].

Comstock y Miller [5], afirman que en sus trabajos de investigación observaron diferencias considerables en las toneladas de caña por hectárea y toneladas de azúcar por hectárea del cuatro y ocho por ciento respectivamente en plantas obtenidas por cultivo de tejidos y las plantas tratadas con agua caliente.

Una alternativa que puede ser viable para la eliminación de virus que invaden el meristemo es la inducción de callos [8], la cual consiste en tratamiento de los explantes con sustancias como el 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) para permitir la inducción de callos embriogénicos. Los resultados de ensayos recientes demuestran que la dosis de 3 mg/L de 2,4-D induce un desarrollo adecuado del tamaño del callo [15] y [19].

Parmesur y Sauntally et al, [13] en sus ensayos con caña de azúcar utilizaron medios para inducción de callos utilizando 2,4 D en concentraciones de 6.7 g.L⁻¹. Los callos embriogénicos fueron subcultivados a intervalos mensuales y regenerados en un medio desprovisto de 2,4 D [2]. La limpieza a través de callos requiere de menos cuidado que el cultivo de

meristemas y todas las plantas regeneradas están libres de virus. Sin embargo, el cultivo de callos debe ser tratado cuidadosamente debido a posible variación somaclonal.

Otra de las alternativas para la obtención de plantas libres de enfermedades sistémica es la aplicación de calor (termoterapia) [3]. En este sistema la semilla es sometida a una incubadora que le proporciona una temperatura que supera el punto de inactivación térmica de los virus en mención [8].

Livingston y Toussaint et al citados por Parmesur y Sauntally [13] y [14], afirman que se ha reportado el uso de agentes antivirales para la eliminación de algunos virus. Estos compuestos fueron inicialmente utilizados en humanos y animales pero dado su amplio espectro se utilizaron luego para eliminar virus en plantas. Estos dos últimos autores realizaron ensayos en busca de la eliminación de virus mediante el uso del viricida ribavirin en dosis de 10 – 75 mg/l en las variedades de caña de azúcar D 1135, M 13/18, M 168/33 y MB 09/72. El agente antiviral puede ser incluido en el medio de cultivo para la obtención de vitroplantas, aunque los resultados no fueron del todo efectivos.

Ribavirín es un nucleósido sintético estructuralmente relacionado con pyrazofurina (pyrazomycycin) guanosina y xantosina que tiene actividad antiviral contra virus tanto de ADN como de ARN y aunque su mecanismo de acción no ha sido completamente elucidado, parece inhibir la síntesis de ADN y ARN y consecuentemente la síntesis de proteínas y la replicación viral. Comercialmente es vendido con los nombres de Virazole, Rebetol y Copegus [1].

En la actualidad, una alternativa ante la falta de fuentes de resistencia genética puede ser la activación de la **resistencia sistémica adquirida** (SAR), el cual es un mecanismo que activa la expresión de proteínas de resistencia (PR protein) mediante el uso de moléculas **elicitoras** que generan este tipo de respuestas en las células vegetales [11] y [12]. Recientemente se han registrado trabajos en banano, tomate y arroz, en los que han empleado agentes inductores de SAR, entre los que se encuentra el **Acido Salicílico**, el **Acibenzolar-S-Methyl** [16] y [17], **β-aminobutyric acid (BABA)**, **sacarina**; entre otras moléculas [11] y [12].

El actual trabajo de investigación busca la limpieza del virus SCYLV mediante la utilización de técnicas de cultivo de tejidos como la inducción de callos embriogénicos y la extracción de meristemas, sumada a la aplicación del inductor de resistencia sistémica adquirida, ácido salicílico y el agente viricida Ribavirín (Virazole); ambas moléculas son

adicionadas al medio de cultivo durante la fase de multiplicación.

2. Metodología

Para la ejecución del experimento, se garantizó que todo el material a ser ensayado esté infectado con el virus de la hoja amarilla y para ello se seleccionaron canteros cultivados con la variedad CR74-250, que fueron muestreados y enviados al laboratorio y diagnosticados mediante la prueba Tissue Blot Immunoassay (TBIA).

Los tallos que fueron positivos para el virus fueron seleccionados para la extracción de yemas, las cuales fueron tratadas con agua corrida durante 48 horas y posteriormente con agua caliente a una temperatura de 51° C durante una hora y desinfectadas con el fungicida Folicur. Posteriormente se sembraron en bandejas plásticas con un sustrato compuesto por ceniza: cachaza y arena en proporción de 1:1:1 y mantenidas bajo condiciones de invernadero hasta lograr su germinación.

2.1. Termoterapia e introducción del material *in vitro*

Luego de que las plantas germinaron y desarrollaron hasta alcanzar los 5 o 7 cm se procedió a colocarlas en una cámara de termoterapia manteniéndolas a una temperatura de 41°C durante 15 días (figura 1).

Al finalizar el tratamiento de termoterapia, los tallos de cada plántula es cortado desde su base hasta los 3 o 4 cm de longitud, siendo lavadas profusamente con agua corriente y mantenidas en frascos de compota solución antioxidante (ácido cítrico + ácido ascórbico) antes de ingresar a la cámara de flujo laminar para la extracción del meristemo.

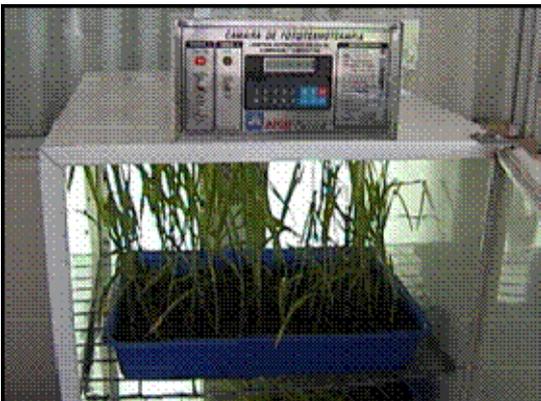


Figura 1. Plántulas sometidas a termoterapia a 41° C durante 15 días.

Previo a la extracción del meristemo en la cámara de flujo laminar, los explantes fueron sumergidos en en agua con solución antioxidante, luego se sometieron a

Hipoclorito de sodio NaOCl al 5% durante 3 min seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril. Luego se colocaron en agua con solución antioxidante estéril durante 10 min.

2.2. Cultivo de meristemos

Meristemos de 0.3 - 0.5 mm de longitud con 1 – 2 primordios fueron extraídos con la ayuda de estereomicroscopio, bisturí y agujas de disección eliminando las vainas foliares y luego colocados en medio MSII en tubos de ensayo con 4 ml de medio de cultivo.

Los meristemos así extraídos se llevan a penumbra durante 10 días, luego se cambia el medio y se colocan en frascos con medio de cultivo nuevo. Se dejan en agitación 20 rpm por 30 días con 12 horas luz.día⁻¹ y una temperatura de 25-26°C.

Las plántulas fueron transferidas a un frasco tipo mayonesa con medio MS II para la multiplicación. Se llevaron al cuarto de multiplicación con un fotoperiodo de 12 horas diarias a una temperatura entre 25-26°C y una luminosidad de 2500 lux. Cada 15 días se realizaron las divisiones, llegando a un máximo de cuatro divisiones para evitar problemas de variación somaclonal.

Para la fase de enraizamiento las plántulas fueron transferidas al medio MSIII utilizando Kinetina y el ácido Indol Butírico, transfiriendo cada macollo de plantas al nuevo medio. En esta etapa las plantas permanecieron por un período de aproximadamente 20 días.

2.3. Inducción y regeneración de callos embriogénicos

Los callos embriogénicos son inducidos a partir de los meristemos extraídos de acuerdo a la metodología arriba descrita, esto es; fueron sometidos a tratamientos de agua corrida, agua caliente, tratamiento fungicida y termoterapia.

Una vez dentro de la cámara de flujo laminar las hojas exteriores de cada explante fueron retiradas y desechadas cuidadosamente con pinzas, agujas de disección y bisturí. La porción central de cada explante es colocada en frascos de compota que contienen medio sólido enriquecido con 2,4 – D (2,4 Diclorofenoxiacético) en concentraciones de 3 mg.L⁻¹, el cual es una auxina que estimula la formación de una masa no diferenciada de células con gran actividad mitótica.

Los frascos sembrados se colocaron en la sala de incubación cubiertas con una tela de color negro para mantenerlos en penumbra por un período aproximado de 30 días hasta observar la formación de una pequeña

masa celular de color blanquecina y consistencia cremosa. A partir de entonces, los explantes son expuestos a la luz para que continúen su crecimiento, manteniéndolos en estas condiciones por lapso de 30 días más.

Una vez establecidos y teniendo una masa celular de aproximadamente 1,5 cm de diámetro, los callos se colocaron en medios frescos y multiplicados a partir de éstos (figura 2), pero sin perder de vista el origen de cada uno de ellos rotulándolos adecuadamente. En este nuevo medio permanecieron por período aproximado de 45 días.

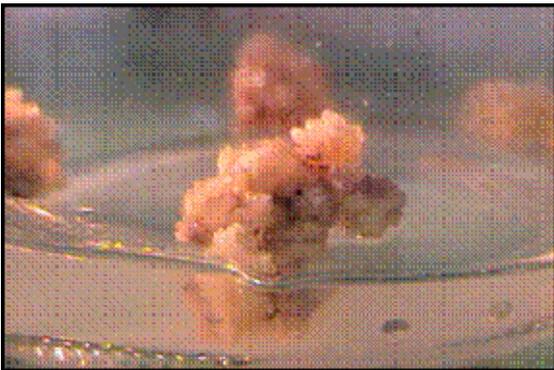


Figura 2. Inducción de callos en medio sólido enriquecido con 2,4-D.

Los callos en estas condiciones podrían ser multiplicados una vez más, pero existe el riesgo de que se induzca **variación somaclonal**, por lo que se decidió no realizar más subcultivos para evitar tal variación.

Para lograr la **regeneración de plantas a partir de callos**, éstos fueron colocados en un medio sólido para su regeneración carente de 2,4-D. A partir de los 25 a 30 días se observaron puntos verdes y de 17 a 20 días los nuevos brotes estaban completamente diferenciados, completando un tiempo de 42 a 50 días en este medio (figura 3).



Figura 3. Regeneración de plantas en medio sólido carente de 2,4-D.

Posterior a ello, los brotes completamente desarrollados y diferenciados fueron transferidos a medio líquido MSII para la obtención de brotes adicionales. En este medio las plantas permanecieron por espacio de 20 días.

2.4. Aplicación de Acido salicílico (AS) y Ribavirín.

Se evaluó la aplicación *in Vitro* del ácido salicílico AS en concentraciones de 100 μ M durante la fase de multiplicación. El elicitor fue agregado al medio de cultivo, esterilizado y dispensado en los frascos de acuerdo con la metodología ya descrita.

De igual forma se aplicó el viricida Ribavirín (Viráosle) al medio de cultivo durante la fase de multiplicación en medio MSII. Para el efecto se utilizó una concentración de 30 ppm.

2.5. Toma de muestras y diagnóstico viral mediante TBIA.

Luego de cuatro meses de ser mantenidas bajo condiciones de invernadero, las plantas fueron muestreadas mediante la extracción de la primera hoja con lígula visible TVD (Top Visible Dewlap Leaf) y luego se realizó la prueba Tissue Blot Immunoassay (TBIA) para diagnosticar la presencia o ausencia del virus.

La prueba TBIA fue desarrollada de acuerdo con Garcés, et al. [8], en la que se utilizaron membranas de nitrocelulosa de la marca Bio-Rad. Las membranas fueron incubadas en agitación a 200 rpm a temperatura ambiente y lavadas tres veces con buffer TBS al final de cada paso.

Al finalizar el protocolo, las membranas fueron observadas con un estereomicroscopio (x100) estableciendo como reacción positiva, aquellas muestras que mostraban manchas de color púrpura intenso, debido a la presencia de precipitados formados por la utilización de PCIB y NBT como sustratos en la reacción inmunoenzimática.

3. Resultados

3.1. Incidencia del patógeno

Luego del diagnóstico viral mediante la técnica TBIA, se observó la incidencia en cada uno de los tratamientos se muestra que los tratamientos inducidos a callos embriogénicos y la aplicación del ácido salicílico 100 μ M, obtuvieron los más bajos niveles de incidencia con el 5% en ambos tratamientos, mientras que los explantes sometidos solamente a la extracción de meristemos y los tratados

con el viricida Rivavirín mostraron incidencias de 6.7% en los dos casos.

Por otra parte, los controles con solo termoterapia y el testigo absoluto que únicamente fue sometido a tratamientos de agua caliente, mostraron incidencias del 86.7% y 90% respectivamente (Figura 1).

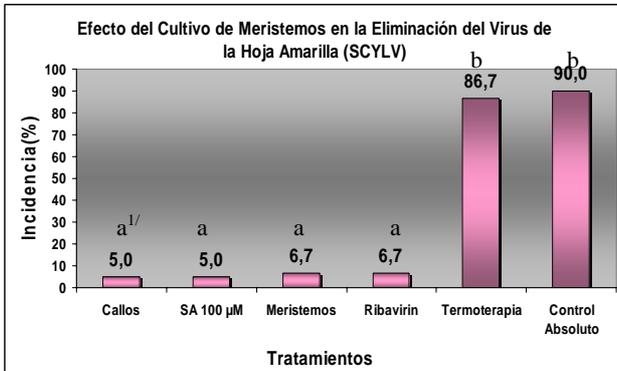


Figura 1. Incidencia del virus SCYLV en plantas de la var. CR74-250 tratadas in Vitro, agua caliente y termoterapia. 1/ Promedios con las mismas letras son similares estadísticamente (Tukey $p=0.05$)

3.2. Número de brotes por explante

La cuantificación del número de brotes por explante efectuada durante la fase de multiplicación mostró a los callos embriogénicos con 6.4 brotes/explante, mientras que los tratamientos Ribavirín, meristemos y AS 100 µM conforman un segundo grupo en cuanto al número de brotes producidos con 5.0, 5.3, y 5.3 brotes/explante respectivamente (Figura 2).

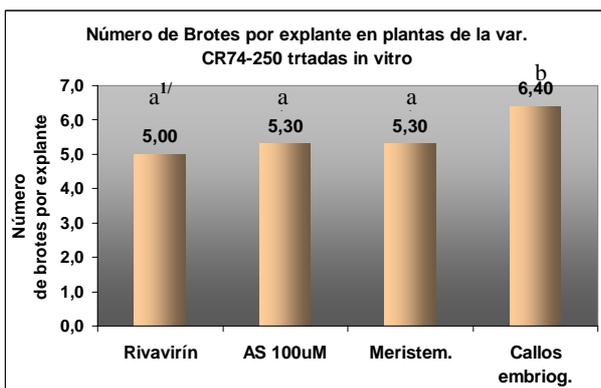


Figura 2. Número de brotes por explante observado para cada tratamiento. 1/ Promedios con las mismas letras son similares estadísticamente (Tukey $p=0.05$)

3.3. Grado de fenolización

La variable fenolización mostró a los callos embriogénicos como el tratamiento que mostró menor producción de fenoles liberados al medio de cultivo de

acuerdo a la coloración observada, mientras que los tratamientos Ribavirín y meristemos tuvieron los más altos niveles de fenolización. Por otra parte, el tratamiento AS 100 µM tuvo un comportamiento intermedio a los anteriores tratamientos (Figura 3).

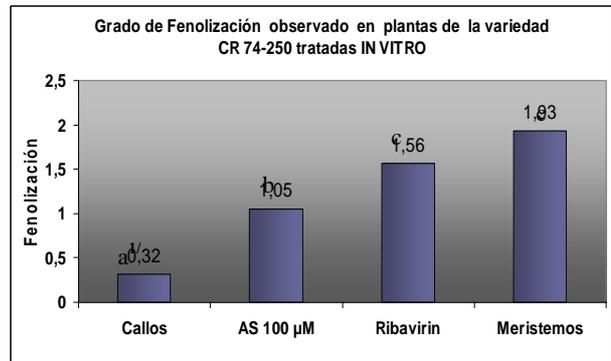


Figura 3. Grado de fenolización observado para cada tratamiento. 1/ Promedios con las mismas letras son similares estadísticamente (Tukey $p=0.05$)

4. Conclusiones

Se pudo corroborar la eficiencia de la extracción de meristemos en la indexación del virus, así como la ineficiencia de la termoterapia y el tratamiento con agua caliente para lograr la limpieza viral; mientras que no hubo diferencias estadísticas al someter los explantes a la extracción de meristemos, inducción de callos embriogénicos y aplicación de los productos Virazole y AS.

Por otra parte, la inducción de callos embriogénicos surge como una alternativa importante para la obtención de plantas libres de virus, sumado al mayor número de brotes por explante obtenidos y la menor producción de fenoles lo que alarga la vida útil del medio de cultivo. Esto podría convertirla en una opción rentable si se trata de producciones comerciales de plantas *in Vitro*.

5. Recomendaciones

Sobre la base de los resultados obtenidos, no se recomienda la utilización de las moléculas AS y Rivavirín como alternativas para la eliminación del virus de la hoja amarilla puesto que existen respuestas muy similares a los tratamientos extracción de meristemos e inducción de callos embriogénicos, por lo que no se justifica la aplicación de estos productos al medio de cultivo.

6. Referencias bibliográficas

[1] AIDSinfo. 2004. Ribavirín. Hoja de datos técnicos (en línea). Consultado 15 may. 2005. Disponible en <http://aidsinfo.nih.gov>.

- [2]Baksha, R.; Alam, R.; Karim, M.; Paul, S.; Hossain, M.; Miah, M. And Rahman, A. 2002. In Vitro Shoot Tip Culture of Sugarcane (*Saccharum officinarum*) Variety Isd 28 (en línea). *Biotechnology*, Volume 1 number 2-4: 67-72. Consultado el 28 may. 2005. Disponible en www.ansinet.org/fulltext/biotech/biotech126-72.pdf
- [3]Castillo, R.; Gomez, A.; y Garcés, F. CINCAE. 2003. Multiplicación masiva de semilla sana en variedades de caña de azúcar mediante cultivo de tejidos vegetales. Publicación técnica No 1.
- [4]Chatenet, M.; Delage, C.; Ripolles, M.; Lockhart, B. And Rott, P. 2001. Detection of Sugarcane Yellow Leaf Virus in Quarantine and Production of Virus-free Sugarcane by Apical Meristem Culture (en línea) *Plant Diseases* 85:1177-1180. Consultado 26 agost. 2005. Disponible en <http://apsnet.org/pd/pdfs/2001/0830-01R.pdf>
- [5]Comstock, J. and Miller, J. D. 2001. Yield Comparisons: Disease-Free Tissue-Culture Versus Bud-Propagated Sugarcane Plants and Healthy Versus Yellow Leaf Infected Plants (en línea). Consultado 06 mar 2005. Disponible en www.asct.org/journal/JASSCT%20Files/vol24.
- [6]Comstock, J. and R. A. Gilbert, A. 2001. Sugarcane Yellow Leaf Disease (en línea). Consultado el 23 may 2006. Disponible en edis.ifas.ufl.edu/SC074
- [7]Csinos, A.; Pappu, H.; McPherson, R. and Stephenson, M. 2005. Management of Tomato spotted wilt virus in Flue-Cured Tobacco with Acibenzolar-S-Methyl and Imidacloprid (en línea). Consultado 01 dic. 2005. disponible en www.apsnet.org/pd/+toc/2005/dse05tc.htm.
- [8]Diplomado en Protección de plantas (2003, Guayaquil, Ec). 2003. Cultivo in Vitro de células y tejidos vegetales. Ed. Ortega, A. Guayaquil, Ec. 117 p.
- [9]Garcés, F. et al. 2003. Diagnóstico serológico y molecular del virus del síndrome de la hoja amarilla (SCYLV), y las bacterias causantes del raquitismo de la soca *Leifsonia xyli* y la escaldadura de la hoja *Xantomonas albilineans*. Carta informativa Año 6. No 1. Ene. Feb. 2004. CINCAE.
- [10] Garcés, F.; Orellana, E.; y Medina, R. 2004. Estudio de la transmisión del virus del síndrome de la hoja amarilla (SCYLV) y del virus del mosaico (SCMV) por insectos en caña de azúcar del Ecuador. Carta informativa Año 6. No 4. Jul. – Agost. 2004. CINCAE.
- [11]Gozzo, F. 2004. Systemic Acquired Resistance in Crop Protection (en línea). *Outlooks on Pest Management* 10.1564 Consultado 2 jun. 2005. Disponible en www.researchinformation.co.uk/pest/sample/15-1/11-Gozzo.pdf.
- [12]Momol, M.; Olson, S.; Funderburk, J. and Stavisky, J. 2004. Integrated Management of Tomato Spotted Wilt on Field-Grown Tomatoes (en línea). *Plant Diseases* 88:882-890. Consultado el 06 jul. 2005. Disponible en [199.86.26.56/pd/pdfs/2004/0608-01R.pdf](http://www.apsnet.org/pd/pdfs/2004/0608-01R.pdf).
- [13]Parmessur, Y. y Saumtally, A. 2001. Elimination of Sugarcane Yellow Leaf Virus and Sugarcane Bacilliform Virus by tissue culture (en línea). Consultado el 15 sep 2005. Disponible en <http://ncb.intnet.mu/moa/farc/amas2001/pdf/s42.pdf#search=scbv%20saumtally>.
- [14]Parmessur, Y.; Aljanabi, S.; Saumtally, S and Dookun-Saumtally+. 2002. Sugarcane Yellow Leaf Virus and Sugarcane yellows Phytoplasma: Elimination by Tissue Culture (en línea). *Plant Pathology* 51, 561-566. Consultado el 09 marz. 2005. Disponible en www.blackwell-synergy.com/links/doi/10.1046/j.1365-3059.2002.00747.x/full/ - ...
- [15]Pérez, P. 1991. Cultivo de tejidos en la caña de azúcar In . Roca, W. y Mroginski, L. Eds. Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. CIAT Colombia. p. 543 – 575.
- [16]Pradhanang, P.; Momol, P. and Olson, S. 2005. Application of Acibenzolar-S-Methyl Enhances Host Resistance in Tomato Against *Ralstonia solanacearum* (en línea). *Plant Disease* DOI: 10.1094/PD-89-0989. Consultado 07 oct 2005. Disponible en www.apsnet.org/pd/+toc/2005/dse05tc.htm.
- [17]Romero, M.; Kousik, C. and Ritchie D. 2001. Resistance to bacterial Spot in Bell Pepper Induced by Acibenzolar-S-Methyl. The American Phitopatological Society.
- [18]Schenck, S.; Lehrer, A.T.y Wu, K.K. 2001. Yellow Leaf Sindrome (en línea) Hawaii Agriculture Research Center. Pathology Report 68. Consultado 02 jul 2005. Disponible en www.hawaiiag.org/harc/PATH67.pdf.
- [19]Villalobos, I; Arias, O. 2002. Inducción y multiplicación de callos in vitro en tres cultivares comerciales de caña de azúcar (*Sacchaaum spp.*) (en línea). Consultado 13 abr. 2005. Disponible en fbio.cu/files/pnac.pdf.