

## Agresividad diferencial entre aislados de *Botrytis cinerea* Pers. en *Fragaria vesca* L. cv. Albion



### Differential aggressiveness amongs *Botrytis cinerea* Pers. isolates in *Fragaria vesca* L. cv. Albion

<http://opn.to/a/Z6iDX>

Michel Leiva-Mora <sup>1\*</sup>, Juan Gabriel Panimboza-Yanzapanta <sup>1</sup>, Fernando Rivas-Figueroa <sup>1</sup>, Alvaro Rivera-Casignia <sup>1</sup>, Carlos Carpio <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Recursos Naturales, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.

**RESUMEN:** La agresividad de los hongos fitopatógenos se define como el efecto cuantitativo negativo que causan sobre sus respectivos hospedantes. En el presente trabajo se recolectaron frutos de fresa del cultivar Albion con síntomas del moho gris en la finca del señor Juan Panimboza Yanzapanta, del cantón Cevallos en la provincia Tungurahua de Ecuador, en el periodo de diciembre 2016 a marzo de 2017. Los ensayos de inoculación se realizaron sobre frutos maduros de fresa del cv. Albion. Los frutos fueron sumergidos en suspensiones conidiales de los diferentes aislados y se dejaron secar en cabina de flujo laminar. Posteriormente, se colocaron en bolsas herméticas con una porción de algodón humedecido y se incubaron a 20°C y en oscuridad durante 10 días. Mediante la técnica del cultivo monospórico, se obtuvieron nueve aislados de *B. cinerea*, patogénicos en frutos del cultivo de fresa cv Albion, aunque los más agresivos fueron los aislados CC-ESPOCH-Bc-6, CC-ESPOCH-Bc-4 y CC-ESPOCH-Bc-7. Los resultados presentados constituyen el primer informe que muestra agresividad diferencial de aislados de *B. cinerea* en *F. vesca* cv. Albion en Ecuador, lo cual sienta las bases para estudios futuros que permitan identificar los factores de virulencia de poblaciones ecuatorianas de *B. cinerea* en fresa y con ello seleccionar fuentes de resistencia durables.

**Palabras clave:** ascomicete, fresa, moho gris, virulencia.

**ABSTRACT:** Aggressiveness in plant pathogenic fungi is defined as the negative quantitative effect they cause on their respective hosts. In the present work, fruits of strawberry (*Fragaria vesca* cv. Albion) with symptoms of gray mold (*Botrytis cinerea* Pers.) were collected from the farm property of Mr. Juan Panimboza Yanzapanta in the Cevallos canton of the Tungurahua province. Ecuador, from December 2016 to March 2017. The inoculation trials were performed on ripe strawberry fruits of the cv. Albion. The fruits were immersed in conidial suspensions of the different fungal isolates and left in the laminar flow cabinet. They were then placed in hermetic bags with a piece of moistened cotton wool and incubated at 20°C in the dark for 10 days. Nine isolates of *B. cinerea* pathogenic to the strawberry fruit were obtained, but the most aggressive were the isolates CC-ESPOCH-Bc-6, CC-ESPOCH-Bc-4, and CC-ESPOCH-Bc-7. This is the first report on differential aggressiveness of *B. cinerea* isolates in *F. vesca* cv. Albion in Ecuador, which provides the basis for future studies on the identification of virulence factors developed by the Ecuadorian populations of *B. cinerea* in strawberry and, with it, the selection of durable sources of resistance.

**Keywords:** ascomycete, gray mold, strawberry, virulence.

### INTRODUCCIÓN

*Botrytis cinerea* Pers. es causante de enfermedades en más de 200 especies de plantas. Durante el proceso infectivo ocurren los siguientes estadios: penetración de la superficie

de los tejidos, muerte de los tejidos del huésped que conduce a la aparición de las primeras lesiones, su expansión de las lesiones, maceración de los tejidos y, finalmente, se observa la esporulación (1).

\*Autor para correspondencia: Michel Leiva Mora. E-mail: [michel.leiva@esPOCH.edu.ec](mailto:michel.leiva@esPOCH.edu.ec)

Recibido: 09/01/2018

Aceptado: 15/02/2019

En el cultivo de fresa, *B. cinerea* ataca durante todo el año, fundamentalmente cuando existen condiciones de alta humedad. Sus síntomas se localizan, sobre todo, a nivel de flores y frutos. La enfermedad se conoce comúnmente como el moho gris, causante de la pudrición de los frutos. Los conidios se pueden observar en los cálices de flores, hojas muertas y frutos momificados (2).

En Ecuador se producen anualmente más de 30 000 toneladas de fresa, las cuales se consumen tanto en forma fresca como procesada, en jaleas, yogurt, helados y mermeladas. Sin embargo, ocurren cuantiosas pérdidas de frutos, principalmente en la poscosecha y son causadas por *B. cinerea* (3).

*B. cinerea* es un ascomicete fitopatógeno necrotrófico; tiene la capacidad de provocar la muerte de las células de los tejidos de sus hospedantes mediante la activación de un amplio repertorio de factores de virulencia, como son la producción de toxinas, las especies reactivas de oxígeno, la inducción de estrés oxidativo en las células de los tejidos afectados, la producción de un gran arsenal de enzimas degradativas, los compuestos de bajo peso molecular como el ácido oxálico e inducción de la muerte celular programada. Por estos motivos, *B. cinerea* puede nutrirse de diferentes especies vegetales (4).

En ocasiones, la incidencia y la severidad de los daños ocasionados por *B. cinerea* en fresa, en algunas regiones del país, pueden variar en dependencia de las variedades que se utilizan, las condiciones del manejo del cultivo, el clima y la variabilidad patogénica y la agresividad que existan entre los aislados que conforman la población de este agente fitopatógeno (5,6).

En Ecuador se desconoce la variabilidad, en términos de patogenicidad y agresividad, entre aislados procedentes de poblaciones de *B. cinerea* que afecten el cultivo de fresa, pues no se dispone de estudios centrados en estos aspectos. El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la agresividad entre aislados monospóricos obtenidos a partir de frutos de fresa que mostraban síntomas del moho gris en la provincia Tungurahua, Ecuador.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Recursos

Naturales de la Escuela Superior Politécnica del Chimborazo (FRN-ESPOCH), durante el periodo de diciembre de 2016 a marzo de 2017.

### Toma de muestras

Las muestras de frutos enfermos se obtuvieron de la finca del señor Juan Panimboza Yanzapanta, del cantón Cevallos en la provincia Tungurahua de Ecuador, en el periodo de diciembre 2016 a marzo de 2017.

### Obtención de los aislados

Para la obtención de aislamientos monospóricos se siguió el método sugerido por Silva-Moreno (7): se tomó una pequeña porción de micelio con esporas de las placas Petri (90 mm Ø), que contenían 20 ml del medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA, Difco™). La porción de micelio tomada, mediante un horadador, fue de 10 mm de diámetro, a partir de cultivos de siete días de crecidos a 20°C. El micelio de cada aislado se suspendió en un tubo de ensayo estéril que contenía 10 ml de agua destilada estéril.

Después de la agitación mediante *vortex* durante un minuto, parte de la suspensión conidial (1 ml) se vertió en placas Petri (90 mm Ø) que contenían 20 ml de Agar Agua (95279 Sigma-Aldrich) al 2 % y se diseminó mediante una espátula de Drigalski. Posteriormente, las placas se colocaron en posición vertical y se incubaron a 20°C, en oscuridad durante 24 h. Los conidios germinados se visualizaron con un estereoscopio (Ivimen®, Modelo Cod. 5313308) con un aumento de 40X. Se tomaron conidios individuales germinados con una aguja y se transfirieron a placas Petri (90 mm Ø) que contenían 20 ml del medio de cultivo PDA (Difco™), las cuales se incubaron a 20°C durante siete días.

Para la identificación de la especie *B. cinerea* se siguieron los criterios sugeridos por Elad *et al.* (8). Para la observación de los aislados se prepararon láminas de portaobjetos de micelio con estructuras reproductivas y se les añadió una gota de lactofenol con el colorante algodón azul. Se examinaron las estructuras reproductivas de los diferentes aislados en un microscopio binocular (Ivimen®, modelo 701, Cod. 5313101) con aumento de 200 X, para confirmar los criterios morfológicos informados para dicha especie.

## Ensayos de patogenicidad

Para estos ensayos se utilizaron 10 frutos de *Fragaria vesca* cv. Albion por cada aislado y otros 10 se usaron como control de inoculación y se inocularon con agua estéril. La inoculación se realizó por inmersión de los frutos en una suspensión de conidios de aproximadamente  $1.2 \times 10^5$  conidios.  $\text{ml}^{-1}$  para cada aislado. Posteriormente, los frutos se dejaron secar sobre papel absorbente (Duramax®) durante una hora en una cabina de flujo laminar vertical (Airstream® Gen 3). Una vez secos los frutos, se colocaron individualmente en bolsas herméticas (ZiplocMulti-Pack) con cierre dentado y se incubaron a 20°C y oscuridad durante 10 días. Sobre la base de la sintomatología observada, se confeccionó una escala de evaluación basada en el porcentaje de frutos con síntomas con la cual se realizaron evaluaciones diarias. Este ensayo se repitió dos veces bajo las mismas condiciones.

## Evaluaciones y variables

Las evaluaciones se realizaron diariamente registrando el valor del grado de la escala de evaluación; con ello se calcularon las siguientes variables:

*Intensidad de ataque (IA)*: este índice se calculó según lo sugerido por Townsend y Heuberger (9) acorde con la siguiente fórmula:  $IA(\%) = 100 \times \sum (a \cdot b) / N \cdot T$  Donde IA (%) es intensidad de ataque expresada en porcentaje, n= número de frutos en cada nivel; b= valor de la severidad acorde con la escala; N= 5, corresponde con el número de estadios de la escala y T= total de frutos evaluados por aislamiento.

*Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE)*: para estimar el ABCPE se utilizó el método de integración trapezoidal, discretizando la variable de tiempo (horas) y calculando la intensidad media de la enfermedad entre cada par de puntos temporales adyacentes (10). Se consideraron los puntos de tiempo de la muestra en una secuencia  $\{t_i\}$ , donde se observaron mayores diferencias respecto a la agresividad. Se tomaron las medidas asociadas al nivel de enfermedad  $\{y_i\}$ . Se consideró el ABCPE en el tiempo  $t = t_k$ , como la enfermedad acumulada total hasta  $t = t_k$  y se utilizó la

fórmula:

$$ABCPE = \sum_{i=1}^{Nt-1} \frac{(y_i + y_{i+1} + 1)}{2} (t_{i+1} - t_i)$$

## Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado para los dos ensayos de inoculación; los análisis estadísticos del ABCPE promedio de los dos ensayos se efectuaron mediante el uso del paquete SPSS (Statistical Package for the Social Sciences Version 15.0) software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Para la comparación de la agresividad de los aislados se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

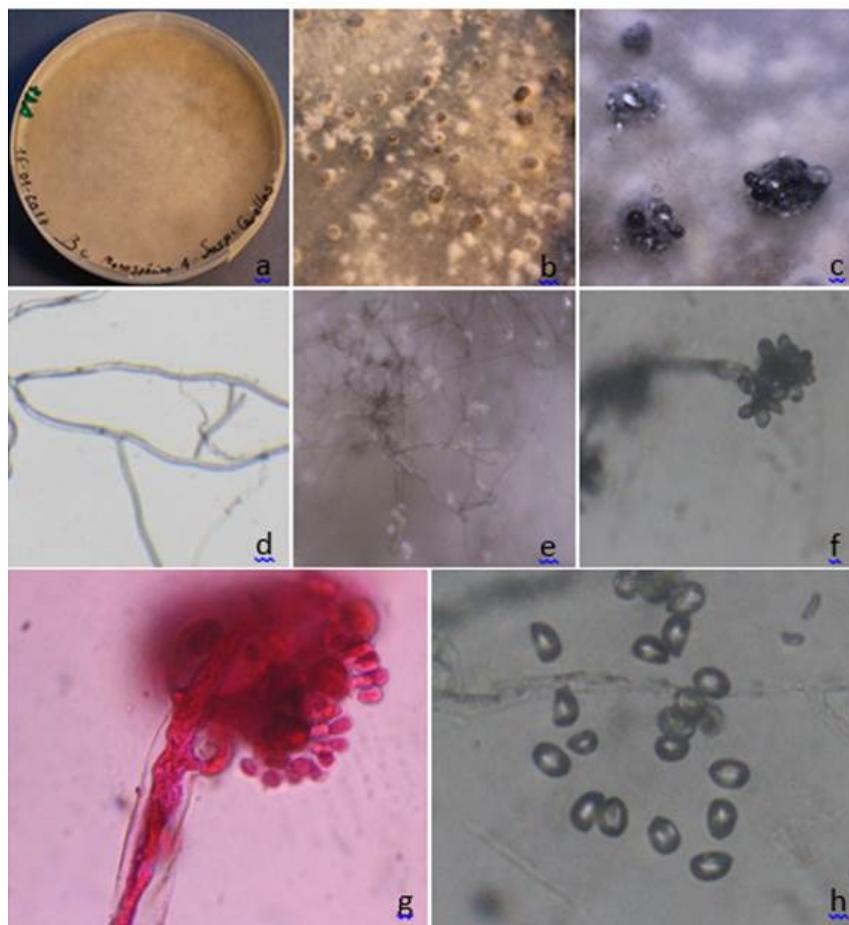
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron nueve aislados monospóricos a partir de frutos de frutilla cv. Albion con síntomas típicos del moho gris. En todos los aislados se observaron colonias con micelio blanco, denso, piloso que, posteriormente, se tornó gris (Figura 1 a). La presencia de esclerocios en las colonias de *B. cinerea* comenzaron a observarse a los 21 días; a los 35 días alcanzaron completamente el color negro debido a la melanización de los mismos (Figura 1 b y c). Las hifas fueron septadas, hialinas y ramificadas de manera irregular o dicotómica (Figura 1 d), similares a las descritas para los aislados de esta especie que afectaban al melocotón en Ecuador (11). La morfología de los macroesclerocios fue similar a la descrita por Dashwood y Fox. (12). La mayoría de las especies del género *Botrytis* forman esclerocios; sin embargo, la abundancia dependerá de las condiciones de incubación, el aislado y el medio de cultivo utilizado. Dichas estructuras están diseñadas para sobrevivir a condiciones ambientales adversas (13).

Se observó la presencia de conidióforos septados, macronematosos, que nacieron directamente del micelio sin formar una estructura especializada (Figura 1 d). El extremo de cada conidióforo finalizó en una estructura similar a una ampolla donde se desarrollaron conidios solitarios, unicelulares, lisos, globosos (Figura 1 f, g, h) con dimensiones promedios de  $9-11 \times 6-7 \mu\text{m}$ . Estas características descritas fueron similares a las informadas anteriormente por Lalève *et al.* (15) y por Elad (6).

En la mayor parte de los aislados se observaron numerosos microesclerocios negros en el medio de cultivo PDA (Fig 2).

En los ensayos de patogenicidad se observó que, a partir del segundo día de inoculación, en algunos aislados los frutos comenzaron a mostrar



**Fig. 1.** Características morfológicas de *B. cinerea* en el medio de cultivo PDA. Característica de una colonia a los siete días (a), presencia de esclerocios a los 21 días (b), melanización de los esclerocios a los 35 días (c), hifas septadas, hialinas y ramificadas de manera dicotómica (d), conidióforos que nacieron directamente del micelio (e y f), conidióforo macronematosos (g), conidios solitarios, unicelulares, lisos, globosos (h) / Morphological characteristics of *B. cinerea* on PDA culture medium. Characteristics of a colony at 7 days (a), presence of sclerotia at 21 days (b), melanization of sclerotia at 35 days (c), Hyaline septate hyphae branching dichotomously, (d), conidiophores born directly from mycelium (e and f), macronematose conidiophores (g), lonely conidia, unicellular, smooth and globose (h).



**Fig. 2.** Microesclerocios negros presentes en el medio de cultivo PDA a los 14 días / Black microsclerotia on PDA culture media at 14 days.

la presencia de un micelio blanco con bordes acuosos. A partir del sexto día, en algunos aislados se detectó la presencia de micelio de color gris, debido a la formación de conidios sobre la superficie de los frutos afectados. Sobre la base de la sintomatología observada se logró confeccionar una escala diagramática cuantitativa con su correspondencia visual (Tabla 1), que fue utilizada para el cálculo de la intensidad de ataque de cada aislado de *B. cinerea*. Los síntomas observados en los ensayos de inoculación fueron similares a los descritos por Dashwood y Fox (12).

Todos los aislados de *B. cinerea* fueron patogénicos y se observó un crecimiento en forma de moho gris aterciopelado en los frutos de fresa inoculados, que provocó lesiones de color marrón claro, las cuales prevalecieron en el extremo inferior de los frutos inoculados. Al inicio del proceso infeccioso se observó en los frutos una masa micelial de aspecto algodonoso y color blanco y, posteriormente, se tornaron de color gris debido a la presencia de esporas. En ambos ensayos de inoculación no se observaron frutos secos, duros ni momificados, lo cual pudo deberse a la alta humedad presente en las bolsas herméticas por la presencia de algodón

humedecido, que favoreció la pudrición blanda y que a los diez días culminaron los dos ensayos de inoculación.

Los aislados más agresivos fueron CC-ESPOCH-Bc-6, CC-ESPOCH-Bc-7 y CC-ESPOCH-Bc-9, pues provocaron los mayores valores del ABCPE, desde las 96 h hasta las 168 horas posteriores a la inoculación de los frutos (Tabla 2).

En relación con el análisis de patogenicidad y agresividad entre aislados de *B. cinerea*, autores como Lorenzini y Zapparoli (16) determinaron, mediante ensayos de inoculación, que todos los aislados evaluados fueron patogénicos, aunque cuatro de los aislados fueron los más agresivos sobre la base del índice de infección y del diámetro de las lesiones necróticas. Sin embargo, en los ensayos del presente estudio solo se determinó el ABCPE para diferenciar la agresividad entre los aislados obtenidos.

Asimismo, se ha apreciado diferencia en la agresividad de aislados de *B. cinerea* inoculando frutos de fresa. An *et al.* (17) utilizaron el método de inoculación de frutos de fresa para comparar la agresividad de cepas de *Botrytis* y sus mutantes deficientes en la síntesis de Acuoporinas. Estos autores también evaluaron el

**Tabla 1.** Escala diagramática cuantitativa basada en la sintomatología de *B. cinerea* observada en frutos de *Fragaria vesca* L. cv. Albion/ Diagramatic quantitative scale based on the de *B. cinerea* symptomatology on fruits of *Fragaria vesca* L. cv. Albion.

Grado	Descripción	Correspondencia visual
0	Fruto sin síntomas	
1	Menor de ¼ del fruto con síntomas	
2	De ¼ a ½ del fruto con síntomas	
3	De ½ a – del fruto con síntomas	
4	Más de – del fruto con síntomas	

**Tabla 2.** Agresividad de aislados de *B. cinerea* sobre la base de los valores del ABCPE desde las 96 h hasta 168 horas posteriores a la inoculación (hpi) de frutos de *Fragaria vesca* L cv. Albion. / Aggressiveness of *B. cinerea* isolates according to values of AUDPC from 96 h to 168 h after inoculation (hpi) of fruits of *Fragaria vesca* L cv. Albion

Cepas	ABCPE <sub>96-168 hpi</sub>	
	Medias reales	Rangos promedios
CC-ESPOCH-Bc-1	148,00	54,40 b
CC-ESPOCH-Bc-2	148,80	54,30 b
CC-ESPOCH-Bc-3	58,80	26,75 c
CC-ESPOCH-Bc-4	165,60	60,40 b
CC-ESPOCH-Bc-5	116,40	45,85 bc
CC-ESPOCH-Bc-6	208,80	77,65 a
CC-ESPOCH-Bc-7	165,60	61,45 ab
CC-ESPOCH-Bc-8	148,80	55,60 b
CC-ESPOCH-Bc-9	162,00	61,60 ab
Control Agua estéril	0	7,00 d

Rangos promedios que en una misma columna tengan letras no comunes, difieren según la prueba de Kruskal Wallis, complementada con la prueba U de Mann Whitney para  $p < 0,05$  con  $n=10$ .

desarrollo de las lesiones necróticas sobre los frutos, lo cual en este trabajo no se tomó en consideración.

Otros autores utilizaron este mismo ensayo de inoculación para evaluar la agresividad de mutantes de *B. cinerea*, algunos de los cuales mostraron un desarrollo de síntomas reducido en relación con la cepa silvestre (18). Lograron determinar que los mutantes deficientes de enzimas degradadoras de la pared celular y la producción de toxinas fueron los principales factores que justificaron la pérdida de la capacidad virulenta. A diferencias de estos autores, en el presente trabajo no se determinó la actividad enzimática celulasa, endopoligalacturonasa ni pectin metilesterasa; tampoco la producción de ácidos mediante ensayo cualitativo ni la capacidad de formación de apresorios.

Esta investigación constituye el primer trabajo donde se confirma la variabilidad en agresividad entre aislados de *B. cinerea* obtenidos a partir de frutos de fresa con síntomas de pudrición gris del cv. Albion en Ecuador. Este aspecto que sienta las bases para realizar estudios futuros con el objetivo de identificar los determinantes de agresividad y los factores de patogenicidad a nivel bioquímico y molecular, lo cual podría sugerir nuevas dianas moleculares para lograr un manejo más eficiente del moho gris de la fresa.

## CONCLUSIONES

Los aislados compartieron características morfológicas similares a la especie *Botrytis cinerea* y todos fueron patogénicos, aunque los más agresivos fueron CC-ESPOCH Bc-6, CC-ESPOCH Bc-7 y CC-ESPOCH Bc-9. Lo anterior constituye el primer informe de la existencia de variabilidad en la agresividad entre aislados *B. cinerea* procedentes de poblaciones en condiciones naturales que afectan a *F. vesca* L cv. Albion en Ecuador.

## AGRADECIMIENTOS

La presente investigación fue apoyada y financiada por el Proyecto de vinculación Aplicación de tecnologías fitosanitarias para la protección de mora, frutilla y tuna y por los miembros del laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales de la Escuela Superior Politécnica del Chimborazo (FRN-ESPOCH), motivo por el cual los autores de esta publicación desean agradecer sinceramente su apoyo y colaboración.

## REFERENCIAS

- Herrera-Romero I, Ruales C, Caviedes M, Leon-Reyes A. Postharvest evaluation of natural coatings and antifungal agents to control *Botrytis cinerea* in Rosa sp. *Phytoparasitica*. 2017; 45(1):9-20.

2. Braun PG, Sutton JC. Infection cycles and population dynamics of *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 1988; 10(2):133-141.
3. Casignia R, Mauricio Á, Rivas Figueroa F, Yanzapanta P, Gabriel J, Lumbi W, et al. Efecto del iodocitrato de cobre (Citrubact) sobre *Botrytis cinerea* Pers en *Fragaria vesca* L. cv. Albion en la provincia Tungurahua, Ecuador. *Centro Agrícola*. 2017; 44(4):82-87.
4. Williamson B, Tudzynski B, Tudzynski P, van Kan JA. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular plant pathology*. 2007; 8(5):561-580.
5. Garrido C, González-Rodríguez VE, Carbú M, Husaini AM, Cantoral JM. Fungal Diseases of Strawberry and their Diagnosis. *Strawberry: Growth, Development and Diseases*. 2016. 157 pp.
6. Elad Y. Cultural and Integrated Control of *Botrytis* spp. In: *Botrytis-the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems* (pp. 149-164). Springer International Publishing. 2016.
7. Silva-Moreno E, Brito-Echeverría J, López M, Ríos J, Balic I, Campos-Vargas R, et al. Effect of cuticular waxes compounds from table grapes on growth, germination and gene expression in *Botrytis cinerea*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2016; 32(5):1-6.
8. Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N. *Botrytis: biology, pathology and control* (pp. 1-6). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 2004.
9. Townsend GR, Heuberger JW. Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. *Plant Dis. Rep.* 1943; 27(17):340-343.
10. Jeger MJ, Viljanen-Rollinson SLH. The use of the area under the disease-progress curve (AUDPC) to assess quantitative disease resistance in crop cultivars. *TAG Theoretical and Applied Genetics*. 2001; 102(1):32-40.
11. Abata LK, Izquierdo AR, Viera W, Flores FJ. First report of *Botrytis* rot caused by *Botrytis cinerea* on peach in Ecuador. *Journal of Plant Pathology*. 2016; 98(3):690.
12. Dashwood EP, Fox RA. Infection of flowers and fruits of red raspberry by *Botrytis cinerea*. *Plant pathology*. 1988; 37(3):423-430.
13. Coley-Smith JR. Sclerotia and other structures in survival. In: Coley-Smith JR, Verhoeff K and Jarvis WR (eds) *The Biology of Botrytis*. Academic Press, London, UK. 1980. pp. 85-114.
14. Alam MW, Rehman A, Gleason ML, Malik AU, Amin M, Rosli H, et al. First report of *Botrytis* spp. as a postharvest pathogen of strawberry in Pakistan. *Journal of Plant Pathology*. 2017; 99(1):297.
15. Lalève A, Gamet S, Walker AS, Debieu D, Toquin V, Fillinger S. Site-directed mutagenesis of the P225, N230 and H272 residues of succinate dehydrogenase subunit B from *Botrytis cinerea* highlights different roles in enzyme activity and inhibitor binding. *Environmental microbiology*. 2014; 16(7):2253-2266.
16. Lorenzini M, Zapparoli G. An isolate morphologically and phylogenetically distinct from *Botrytis cinerea* obtained from withered grapes possibly represents a new species of *Botrytis*. *Plant pathology*. 2014; 63(6):1326-1335.
17. An B, Li B, Li H, Zhang Z, Qin G, Tian S. Aquaporin regulates cellular development and reactive oxygen species production, a critical component of virulence in *Botrytis cinerea*. *New Phytologist*. 2016; 209(4):1668-1680.
18. Zang J, Yuan X, Zhao F, Zhang K, Cao H, Zhang J, et al. The BcSDR1 gene is required for growth, development, and pathogenicity of *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2018; 103:122-129.

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

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)