

EVALUACIÓN DE LA TOLERANCIA A LA SEQUÍA EN GENOTIPOS DE TRIGO (*Triticum aestivum* L.) OBTENIDOS EN CUBA POR INDUCCIÓN DE MUTACIONES

L. M. González[✉], L. Argentel, Aliuska Estrada, Nircia Saldivar y R. Ramírez

ABSTRACT. Drought tolerance in Cuban wheat genotypes obtained by mutation induction was studied considering seedling germination and growth as well as agricultural yield and soil depth for root exploration. Genotypes were defined in two groups using the Cluster analysis based on Euclidean distance for the initial stages of plant growth tolerance indexes and in three groups based on harvest indexes, showing the presence of genetical variability and recording the best behavior in INIFAT RM-26 and INIFAT RM-36; therefore, these varieties can be introduced in areas with a low water supply. The coincidence coefficient value $W=0.82$ revealed the existence of a high congruence degree among the established classifications, indicating the possibility to evaluate drought tolerance based on seedling growth and other agronomical indicators during harvesting.

Key words: drought stress, yield, depth, roots, wheat

RESUMEN. Se estudió la tolerancia a la sequía en genotipos cubanos de trigo obtenidos por inducción de mutaciones sobre la base de la germinación y el crecimiento de las plántulas y sobre la base del rendimiento agrícola y la profundidad que exploran las raíces en el suelo. A través del análisis de Conglomerado Jerárquico y de Ligamiento Completo sobre la base de la distancia Euclidiana, los genotipos se reunieron en dos grupos según los índices de tolerancia medidos en las etapas iniciales del desarrollo de las plantas y en tres sobre la base de los índices medidos en la cosecha, indicando la existencia de variabilidad genética. En los materiales introducidos, destacándose las variedades INIFAT RM-26 e INIFAT RM-36 como las de mejor comportamiento, por lo que pueden ser introducidas en áreas con bajos suministros de agua. El valor del coeficiente de coincidencia $W=0.82$ reveló la existencia de un alto grado de congruencia entre las clasificaciones establecidas, lo que denota la posibilidad de complementar las evaluaciones de la tolerancia a la sequía con indicadores del crecimiento de las plántulas e indicadores agronómicos durante la cosecha.

Palabras clave: estrés de sequía, rendimiento, profundidad, raíces, trigo

INTRODUCCIÓN

La sequía conjuntamente con la salinidad de los suelos son un grave problema, que afectan el rendimiento de los cultivos y la sostenibilidad de la agricultura. Cerca del 10 % de la superficie del planeta está afectada por estos problemas y unas 10 millones de hectáreas se abandonan debido a ellos (1, 2, 3).

En Cuba, la sequía ha perjudicado cerca del 76 % de las áreas de cultivo y según informes del Ministerio de la Agricultura (4), las provincias orientales cuentan con un elevado índice de tierras afectadas por tales problemas.

Una solución parcial a este problema es la implantación de cultivos y variedades más tolerantes a la sequía,

lo que implica conocer dicha tolerancia de forma precisa y consistente, y evaluar el mayor número de especies posibles (5, 6, 7).

El trigo es una de las especies más antiguas cultivadas por el hombre y constituye, según informes de la FAO (8), la base de la alimentación de más del 96.4 % de la población mundial. Fue introducido en Cuba por los españoles en los primeros años de la conquista, y su cultivo fue muy floreciente en la zona central de la isla. Sin embargo, años más tarde, su cultivo decayó por órdenes del Rey de España, de importar la harina de Castilla, por el floreciente auge de los cultivos de la caña de azúcar y el tabaco, y por la incidencia de plagas y enfermedades que afectaron las pocas variedades existentes (9).

Durante la época prerrevolucionaria, se intentó rescatar el cultivo del trigo sobre la base de variedades importadas, de las cuales se distribuyeron semillas entre los agricultores de diferentes localidades del país, principalmente de la región central. Sin embargo, tal acción no culminó con éxito, debido a la poca adaptabilidad y esta-

Dr.C. L. M. González, Investigador Titular del Laboratorio de Técnicas Nucleares; Aliuska Estrada y Nircia Saldivar, Investigadores Agregados; Ms.C. R. Ramírez, Investigador Auxiliar del Centro de Investigaciones, Servicios y Tecnologías Ambientales, Instituto de Investigaciones Agropecuarias "Jorge Dimitrov", Gaveta Postal 2140; L. Argentel, Profesor Instructor de Matemática; Universidad de Granma, carretera a Manzanillo km 17½, Peralejo, Bayamo 85100, Granma Cuba.

✉ lmgonzalez@dimitrov.granma.inf.cu, leandris@udg.co.cu

bilidad que presentaron dichas variedades y a la falta de existencia de un programa de mejora financiado y orientado en tal dirección, lo que conllevó al Ministerio de la Agricultura a dictaminar lo poco conveniente de su explotación en el país (10).

A pesar de lo anteriormente planteado, en el INIFAT se desarrolló un programa de mejora por selección a partir de la variedad brasileña de trigo blando (*Triticum aestivum* L.) BH-11 y se obtuvo la primera variedad cubana "Cuba-C-204", muy bien adaptada a las condiciones de Cuba (11), de la cual años más tarde y a través de la inducción de mutaciones se han obtenido otros materiales promisorios, con perspectivas para su evaluación e introducción en áreas de producción.

Dada la intensa sequía y escasez de los recursos hídricos que se vienen presentando en las provincias orientales, que han obligado a limitar las áreas dedicadas al cultivo del arroz, se realizan ingentes esfuerzos para introducir otros cultivos menos exigentes al agua y de amplio espectro tanto para la nutrición humana como animal. En tal sentido, se desarrolló el siguiente trabajo, con el propósito de evaluar la tolerancia a la sequía en variedades cubanas de trigo, primeramente, sobre la base del crecimiento de las plántulas en etapas iniciales del desarrollo en condiciones controladas y, en segundo lugar, del rendimiento y la profundidad efectiva que exploran las raíces en el suelo, y establecer el grado de congruencia taxonómica entre las clasificaciones establecidas.

MATERIALES Y MÉTODOS

En un primer experimento se seleccionaron semillas de siete variedades de trigo (Cuba-C-204, INIFAT RM-26, INIFAT RM-29, INIFAT RM-30, INIFAT RM-31, INIFAT RM-32, INIFAT RM-36), las cuales se colocaron a germinar en placas petri con tres capas de papel de filtro y se humedecieron con 15 mL de una solución de PEG-6000 (*Polyetilen glycol*, P.M. 6000) para simular el estrés de sequía, según el método de Michel y Kauffman (12) a presiones osmóticas de -15 Bars. Como control se usó agua destilada con un valor despreciable de presión osmótica. Las placas se colocaron en una cámara de crecimiento del tipo Jacobsen-II, a una temperatura de 28 ± 2 °C, distribuidas en un arreglo al azar y por cada variante experimental se utilizaron 100 semillas repartidas en cuatro réplicas.

A los siete días se evaluó el porcentaje de germinación (G) y a los 15 días se evaluaron la altura de las plántulas (AP), longitud de la raíz (LR) y acumulación de biomasa fresca (MF) y seca (MS) en 20 plántulas por réplica para un total de 100 plántulas por tratamiento. A partir de estos datos se calculó la tolerancia a la sequía (TS), según la fórmula descrita (13).

$$TS = 100 (IE/IC)$$

donde:

IE e IC representan la media de los indicadores evaluados en la solución estresante y control, respectivamente.

Con los datos obtenidos se realizó un análisis de Conglomerado Jerárquico y de Ligamiento Completo, sobre la base de la distancia Euclidiana (14). Este experimento se repitió dos veces en el tiempo, pero por la similitud de los resultados se utilizaron los datos del segundo experimento, como réplicas del primero.

En un segundo experimento, las siete variedades se sembraron el 28 de octubre del 2003 y el 15 de octubre del 2004, sobre un suelo Fluvisol en áreas de la Granja de Producción de Alimento del MININT, siguiendo dos variantes experimentales: un tratamiento, donde se aplicaron seis riegos (fase de germinación, ahijamiento, espigamiento, floración, fase lechosa del grano y durante el llenado de los granos), aplicando una norma de 7 cm de agua en cada tratamiento, donde solo se dio un riego de germinación más el agua de lluvia que cayó que fue de 118 y 122 mm durante los 100 días, que duró el ciclo del cultivo en ambos años y que en la discusión de los resultados lo trataremos como sin riego. Entre los dos tratamientos hubo una separación de 20 m, para evitar cualquier solapamiento de los efectos.

Se usó un diseño de parcela con testigo (Cuba-C-204) intercalado cada tres líneas y se repitió cuatro veces en el espacio. Las parcelas tenían una dimensión de 5 m². En el desarrollo de la experiencia se siguieron las normas establecidas en el Instructivo técnico (15).

Al final de la cosecha se seleccionaron cinco plantas de cada réplica por variedad y se les determinó el nivel de penetración de las raíces en el suelo, según el procedimiento descrito (8) y usando un marco de 1 m² se realizó la cosecha de las parcelas y se estimó el rendimiento agrícola. Los datos del rendimiento se evaluaron por Análisis de Varianza Simple y prueba de Rangos Múltiples de Duncan. Los datos del segundo experimento se utilizaron como réplicas del primero.

Para efectuar un Análisis de Cluster se calculó el índice de tolerancia a la sequía, sobre la base del rendimiento y los datos de la profundidad explorada por las raíces, según la fórmula descrita en el experimento anterior.

Se calcularon, además, el coeficiente de correlación cofenético (16, 17), para determinar el grado de distorsión interna de las matrices y el coeficiente de correlación entre las matrices de similitud, para evaluar el porcentaje de coincidencia entre las clasificaciones obtenidas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de Conglomerado Jerárquico y de Ligamiento Completo a través de la distancia Euclidiana permitió agrupar a los siete genotipos estudiados en dos grupos, en base a los índices de tolerancia medidos en las etapas iniciales del desarrollo de las plantas (Figura 1), lo que revela la existencia de variabilidad entre los materiales evaluados, similar a lo señalado en trigo (18, 19, 20, 21) y en otros cultivos (22, 23).

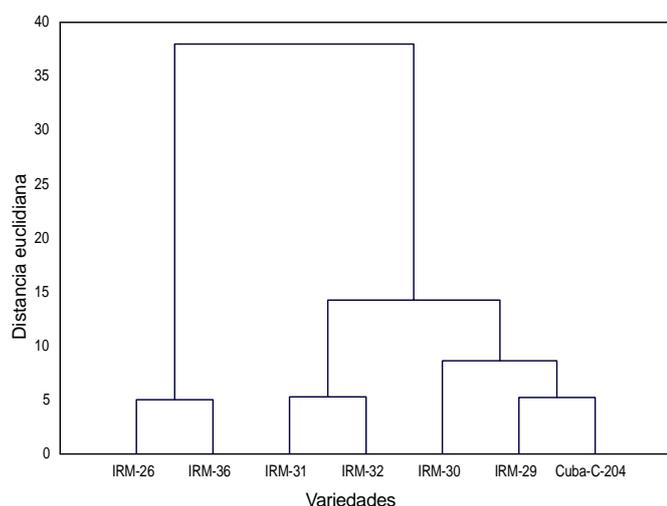


Figura 1. Agrupamiento de las variedades en base a los índices de tolerancia medidos en las etapas iniciales de crecimiento

El grupo I, que reunió a las variedades INIFAT RM-26 e INIFAT RM-36 con lo mayores valores en los índices analizados (Tabla I), resulta el de mayor grado de tolerancia. Este aspecto es importante, dado que la fase de germinación-emergencia se considera una fase crítica del cultivo y estos materiales pudieran ser utilizados como progenitores en programas de mejora, dirigidos a aumentar la tolerancia del cultivo a la sequía durante esta fase. En tal sentido, se ha señalado que al evaluar la tolerancia a la sequía (24), se deben incluir datos sobre la habilidad de las semillas de germinar en condiciones de limitada disponibilidad de agua, dado que el establecimiento exitoso y vigoroso de las plántulas contribuyen indirectamente a mantener altos rendimientos. Por otra parte, el uso de este procedimiento en poblaciones segregantes pudiera facilitar la selección de genotipos, por su habilidad para germinar bajo estrés osmótico y luego evaluar las plántulas selectas o comparándolas con aquellas no seleccionadas por tolerancia a nivel de semilla, lo que facilitará la obtención de ciclos avanzados de selección y brindará información relevante acerca de la conveniencia de seleccionar en los estadios temprano de desarrollo en trigo para tolerancia a la sequía.

En el experimento de campo, se constató un efecto marcado del tratamiento sin riego sobre el nivel de penetración de las raíces y el rendimiento agrícola en las siete variedades evaluadas (Tabla II), destacándose las variedades INIFAT RM-26, INIFAT RM-30 e INIFAT RM-36, por alcanzar sus raíces las mayores profundidades (75-90 cm), lo cual es una ventaja, pues ellas pueden extraer más agua de las capas más profundas del suelo y satisfacer las demandas de evaporación. En tal sentido, se señaló que las

plantas tolerantes a la sequía se caracterizan por un sistema radical profundo y vigoroso (5), mientras que otros indicaron una fuerte asociación entre la tolerancia a la sequía con el largo y la acumulación de biomasa de las raíces (25).

Tabla II. Profundidad del sistema radical y rendimiento agrícola de variedades de trigo cultivadas con y sin riego

Variedad	Penetración de la raíz (cm)		Rendimiento (t.ha ⁻¹)	
	Con riego	Sin riego	Con riego	Sin riego
Cuba-C-204	70-80	60-75	4.31	2.95***
INIFAT RM-36	70-80	75-90	4.06	3.60***
INIFAT RM-29	60-75	45-60	4.32	3.27***
INIFAT RM-32	60-75	70-80	3.34	2.96***
INIFAT RM-31	60-75	45-60	3.82	2.06***
INIFAT RM-26	70-80	75-90	4.04	3.67***
INIFAT RM-30	60-75	75-90	4.49	3.64***

*** Indica diferencias altamente significativas entre tratamientos para cada variedad por la prueba t de Student

Se ha observado que la mayor penetración del sistema radical (6) pudiera estar asociada con un mayor abastecimiento hídrico en condiciones limitantes de agua en el suelo. Por otra parte, se ha señalado que el grado de penetración de las raíces en variedades de trigo (26) puede ser un criterio efectivo para la evaluación y selección de variedades con tolerancia a la sequía, que existe una fuerte correlación positiva (27) entre la profundidad que exploran las raíces, el crecimiento y rendimiento en diversas especies vegetales, los que se recomendaron como indicador eficiente para los programas de selección en condiciones de estrés de sequía.

Las afectaciones en el rendimiento por la sequía oscilaron entre 9-47 %, siendo las variedades INIFAT RM-26 e INIFAT RM-36 e INIFAT RM-30, las que mostraron el mejor comportamiento, por lo que pueden ser consideradas para áreas con bajos suministros de agua.

A diferencia del agrupamiento de las variedades sobre la base de los indicadores medidos en las fases iniciales del crecimiento de las plántulas, del rendimiento y la penetración del sistema radical, se formaron tres grupos, donde el grupo I, compuesto por las variedades INIFAT RM-26, INIFAT RM-36 y INIFAT RM-30, mostraron los valores más altos en los indicadores evaluados y, por ende, el mayor grado de tolerancia (Figura 2, Tabla III). Por otra parte, no obstante observarse la existencia de diferencias entre los fenogramas obtenidos a partir de los diversos caracteres usados, resultó interesante comprobar cómo los cultivares INIFAT RM-26 e INIFAT RM-36, siempre se reunieron en el grupo de mejor comportamiento, lo que sugiere comenzar las pruebas de validación en áreas de producción con bajos suministros de agua o donde las sequías son más frecuentes.

Tabla I. Valores promedio de los índices de tolerancia medidos en las etapas iniciales del crecimiento para cada grupo

Grupos	Variedades	Índices de tolerancia (%)				
		G	AP	LR	MF	MS
I	INIFAT RM-26, INIFAT RM-36	65.6	63.6	48.1	63.8	51.1
II	INIFAT RM-29, INIFAT RM-30, INIFAT RM-31, INIFAT RM-32, Cuba-C-204	44.6	47.3	41.6	47.2	42.4

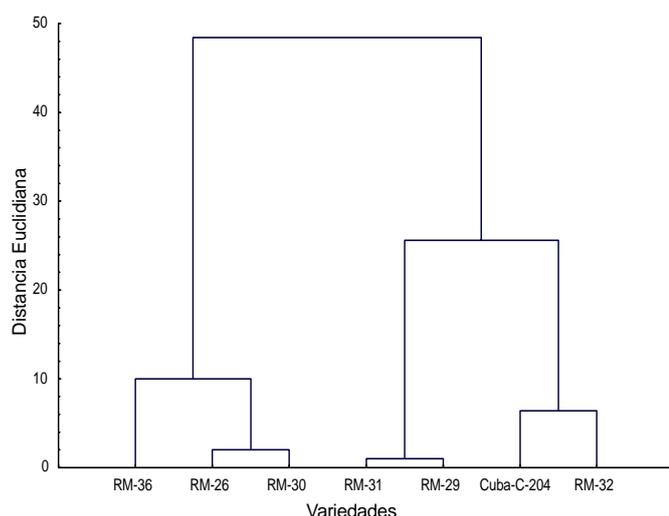


Figura 2. Agrupamiento de las variedades sobre la base de la profundidad efectiva del sistema radical y el índice de tolerancia del rendimiento agrícola

Tabla III. Valores promedio de los índices de tolerancia evaluados en la cosecha para cada grupo

Grupos	Variedades	Índices de tolerancia (%)	
		PSR (cm)	RA
I	INIFAT RM-26, INIFAT-30, INIFAT RM-36	75-90	86
II	INIFAT RM-32, Cuba-C-204	60-75	66
III	INIFAT RM-29, INIFAT RM-31	45-60	53

Una respuesta diferenciada de los genotipos frente a condiciones limitantes de agua, similar a la observada en este estudio, ha sido señalado en trigo (8, 28, 29, 30), la cual pudiera ser muy útil para estudios fisiológicos comparativos, que permitan dilucidar los posibles mecanismos involucrados en la tolerancia al estrés en los genotipos del grupo I.

Al analizar mediante el uso del coeficiente de correlación fenotípica, el grado de distorsión interna existente entre los fenogramas obtenidos, se pudo confirmar un valor relativamente elevado (0.85), lo cual es indicativo de que los fenogramas correspondientes a las Figuras 1 y 2 muestran una adecuada representación de la matriz de similitud asociada. Al respecto, se han señalado que coeficientes cofenéticos superiores a 0.80, resultaban indicativos de una buena representación de la matriz de similitud por parte de los fenogramas establecidos (16, 17).

A pesar de que los dos conjuntos de variables analizadas corresponden a diferentes niveles de complejidad del fenotipo, sobre los cuales actúan fuerzas evolutivas diferentes, el valor del coeficiente de coincidencia $W=0.82$ reveló la existencia de un alto grado de congruencia entre las clasificaciones establecidas, lo que denota la posibilidad de complementar las evaluaciones de la tolerancia a la sequía, con indicadores tanto del crecimiento de las plántulas como agronómicos durante la cosecha. En este sentido, se ha indicado medir el grado de tolerancia a la sequía a través de varios parámetros (26, 31, 32), dado

que la evaluación sobre la base de uno o dos indicadores puede proporcionar valores limitados, dada la multiplicidad de factores y sus interacciones que contribuyen en dicha tolerancia.

En conclusión, se ha observado una variabilidad considerable para la tolerancia a la sequía en los materiales introducidos, destacándose las variedades INIFAT RM-26 e INIFAT RM-36 como las de mejor comportamiento, por lo que pueden ser introducidas en áreas con bajos suministros de agua.

La evaluación de la tolerancia a la sequía sobre la base del rendimiento agrícola, puede ser complementada con la profundidad efectiva que exploran las raíces en el campo e indicadores del crecimiento y la acumulación de biomasa en etapas iniciales del crecimiento de las plantas.

REFERENCIAS

- Royo, A. y Aragues, R. Establecimiento de nuevos índices de tolerancia de los cultivos a la salinidad: la cebada como caso de estudio. *Investigación Agraria. Producción y Producción Vegetal*, 2000, vol. 17, no. 3, p. 410-421.
- Machado, A.; Novella, R.; Yero, F. y Parada, L. Estrés hídrico, mecanismos de resistencia y tolerancia a la sequía. Universidad de Granma, 2004, 20 p.
- Frahm, M. A.; Rosas, J. C.; Mayek-Pérez, N. y López-Salinas, E. Breeding beans for resistance to terminal drought in the lowland tropics. *Euphytica*, 2004, vol. 136, no. 2, p. 223-232.
- Cuba. Minagri. Informe anual sobre la agricultura. Avances y pérdidas. P.P. Granma, Jueves, 25 Diciembre. 2003.
- Matta, F. M. da. Exploring drought tolerance in coffee: a physiological approach with some insights for plant breeding. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 2004, vol. 16, no. 1, p. 1-6.
- Pinheiro, H. A. Physiological and morphological adaptations as associated with drought tolerance in robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre var. Kouillou). [Tesis de grado]; Universidad Federal de Viscosa. 2004.
- Yuen, G.; Luo, Y.; Sun, X. y Tang, D. Evaluation of a crop water stress index for detecting water stress in water wheat in the North China Plain. *Agricultural Water Management*, 2004, vol. 64, no. 1, p. 29-40.
- Kirigwi, F. M.; Van Ginkel, M.; Trethowan, R.; Seaves, R. G.; Rajaran, S. y Paulsen, G. M. Evaluation of selection strategies for wheat adaptation across water regimes. *Euphytica*, 2004, vol. 135, no. 3, p. 361-371.
- Zerquera, C. J. y Montes de Oca, L.. Primeras producciones agrícolas en Trinidad y el Valle de los Ingenios. *Siga la Marcha*, 1998, vol. 11, p. 27-34.
- Cuba. INIFAT. Documentos varios. Archivo del Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt". Inéditos, 1904-1959.
- Cueto, C. Apuntes sobre el cultivo del trigo en Cuba. La Habana: INIFAT, 1996. 15 p.
- Michel, B. F. y Kauffman, M. R. The osmotic potential of polyethylene glycol-6000. *Plant Physiology*, 1973, vol. 51, p. 914-916.

13. González, L. M. /et al./ Desarrollo de metodologías de evaluación para resistencia a la salinidad en arroz. En: Caracterización, funcionamiento y drenaje de vertisuelos. Memorias del Coloquio Cubano-Francés sobre Mejoramiento y Manejo de Vertisuelos. Montpellier: Editorial ENSAM/INRA, 1991. p. 329-336.
14. Sokal, R. P. y Sneath, P. H. A. Principles of numerical taxonomy. San Francisco, 1993, 359 p.
15. Cuba. INIFAT. Instructivo técnico del trigo. La Habana : INIFAT, 2003, 23 p.
16. Iglesias, L. /et al./ Análisis del grado de congruencia taxonómica en la clasificación de variedades de arroz (*O. sativa* L.). *Cultivos Tropicales*, 1994, vol. 15, no. 1, p. 85-89.
17. González, L. M.; Zamora, A. y Céspedes, N. Análisis de la tolerancia a la salinidad en variedades de *Vigna unguiculata* L. sobre la base de caracteres agronómicos, la acumulación de iones y el contenido de proteína. *Cultivos Tropicales*, 2000, vol. 21, no. 1, p. 47-52.
18. Singh, G.; Kaur, P. y Sharma, R. Effect of CCC on seed germination and early seedling growth in wheat under saline conditions. *Indian Journal of Agricultural Science. Plant Physiology*. 1985, vol. 28, no. 4, p. 310-317.
19. Torrecillas, A.; García, A. L.; León, A. y Sánchez-Blanco, M. J. Metabolic responses to low water deficit induced by PEG and NaCl in wheat seedlings. *Agricultura Mediterránea*, 1987, vol. 117, p. 125-129.
20. Pinter, J. R.; Zilopi, G. y Reginato, R. Canopy temperature as an indicator of differential water use and yield performance among wheat cultivars. *Agricultural Water Management*, 1990, vol. 18, p. 35-48.
21. Rodríguez, D. y Goudriaan, J. Effects of phosphorus and drought stress on dry matter and phosphorus allocation in wheat. *Journal of Plant Nutrition*, 1995, vol. 18, no. 11, p. 2501-2517.
22. Gnanasiri, S.; Hahn, D. T.; Rhodes, D. y Joly, R. Leaf water relations and solute accumulation in two grain sorghum lines exhibiting contrasting drought tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 1995, vol. 46, no. 293, p. 1833-1841.
23. McMillin, J. y Wagner, M. Effects of water stress on biomass partitioning of Ponderosa Pine seedlings during primary root growth and shoot growth periods. *Forest Science*, 2003, vol. 41, no. 3, p. 604-610.
24. Biasutti, C. A. y Maich, R. H. Selección por tolerancia al estrés hídrico en trigo (*Triticum aestivum*). *Scientia Agrícola*, 2004, vol. 4, p. 32-38.
25. Ramos, R. L. y Carvalho, A. Shoot and root evaluations on seedling from coffee genotypes. *Bragantia*, 1997, vol. 56, p. 59-68.
26. Narayan, D. y Mishra, R. D. Drought resistance in varieties of wheat (*Triticum aestivum*) in relation to root growth and drought indices. *Indian J. of agricultural Sciences*, 1989, vol. 59, no. 9, p. 595-598.
27. Medrano, H.; Chaves, M. M.; Porqueddu, C. y Carelda, S. Improving forage crops for semi-arid areas. *Agriculture*, 1998, vol. 27, p. 87-94.
28. Heidary, R. y Heidary, M. Evaluation of resistance for salinity, drought, cold and pH changes in four Iranian wheat cultivars. *Journal of Agricultural Science and Natural Resources*, 2002, vol. 9, no. 1, p. 32-38.
29. Ivandic, V.; Hackott, C.; Zhang, Z.; Staub, J.; Nevo, E.; Thomas, W. y Foster, B. P. Phenotypic responses of wild barley to experimentally imposed water stress. *Journal of Experimental Botany*, 2000, vol. 51, no. 353, p. 2021-2029.
30. Awasthi, L. P.; Sing, S. y Mishra, C. H. Morphological characters of shoot and leaf associated with drought tolerance in Indian upland rice. *Crop Research*, 2001, vol. 22, no. 3, p. 454-459.
31. Siddique, M. R.; Hanid, A. y Islam, M. S. Drought stress effects on water relations of wheat. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 2004, vol. 41, no. 1, p. 35-39.
32. Morgan, J. Osmoregulation as a selection criterion for drought tolerance in wheat. *Australian J. of Agricultural Research*, 2004, vol. 34, no. 6, p. 607-614.

Recibido: 27 de enero de 2005

Aceptado: 28 de junio de 2005