

INFLUENCIA DE LA MICORRIZACIÓN EN EL CRECIMIENTO Y LAS RELACIONES HÍDRICAS DE PLANTAS DE TOMATE SOMETIDAS A UN CICLO DE SEQUÍA Y RECUPERACIÓN

J. Dell'Amico[✉], P. Rodríguez, A. Torrecillas, Asun Morte y María de J. Sánchez-Blanco

ABSTRACT. Water stress affected mycorrhizal infection percentage of tomato plants subjected to a 72-hour-nonirrigated period and their further recovery at 120 hours. However, the relatively low colonization had a stimulatory effect on inoculated plant growth, which was more effective on plant top than in its root. Such a huge development was observed on a larger leaf area, maybe due to a greater leaf carbohydrate synthesis ratio. This performance was kept within the recovery period. Developmental changes of mycorrhized plants were associated to a higher stomatal opening and photosynthetic activity together with a bigger root hydraulic conductivity. Although a greater water potential was recorded on inoculated stressed plants, compared to noninoculated ones, the absence of a stressed-plant osmotic fit reduced leaf turgor over the stressing period, that was recovered when irrigation was renewed.

RESUMEN. El estrés hídrico afectó al porcentaje de infección micorrizógena de plantas de tomate sometidas a un período de supresión de riego de 72 horas y posterior recuperación a las 120 horas. Sin embargo, la relativa baja colonización tuvo un efecto estimulante sobre el crecimiento de las plantas inoculadas, siendo más efectivo en el desarrollo de la parte aérea que en el de la raíz. Este mayor desarrollo se observó en un aumento del área foliar, quizás debido a una mayor proporción de síntesis de carbohidratos en las hojas. Este comportamiento fue mantenido durante el período de recuperación. Los cambios en el desarrollo experimentados por las plantas micorrizadas estuvieron asociados con incrementos en la apertura estomática y la actividad fotosintética y, a su vez, acompañados por aumentos en la conductividad hidráulica de las raíces. Aunque el potencial hídrico fue mayor en las plantas estresadas inoculadas que en las no inoculadas, la ausencia de ajuste osmótico en las plantas estresadas provocó un descenso en la turgencia foliar durante el período de estrés que fue recuperada cuando el riego fue reanudado.

Key words: tomato, *Lycopersicon esculentum*, drought stress, vesicular arbuscular mycorrhizae, inoculation, plant water relations

Palabras clave: tomate, *Lycopersicon esculentum*, estrés de sequía, micorrizas arbusculares vesiculares, inoculación, relaciones planta agua

INTRODUCCIÓN

Las micorrizas vesículo-arbusculares (MVA) colonizan las raíces de la mayoría de los cultivos agrícolas, favoreciendo la absorción de nutrientes y agua por este órgano (1). Mediante esta simbiosis, la planta recibe un número de beneficios que en muchos casos se observan en el incremento del crecimiento y la mejora considerable de las relaciones hídricas de la planta (2, 3).

Uno de los mecanismos descritos en la literatura para explicar el incremento de la absorción de agua por las raíces de las plantas inoculadas, está estrechamente vinculado con un aumento de la conductancia de las raíces al flujo hídrico (4), incremento de la longitud radical y alteraciones morfológicas del sistema de raíces (5).

Cuando se ha estudiado el efecto de las MVA sobre la conductancia estomática, en muchos casos esta resulta mayor en las plantas micorrizadas que en las no micorrizadas (6, 7), aún cuando ambas se encuentren a niveles similares de potencial hídrico en el suelo (8, 9). En la mayoría de los casos, estos cambios han estado asociados con alteraciones en la conductividad hidráulica de las raíces (10, 11).

El objetivo del presente trabajo estuvo encaminado a estudiar el efecto de la cepa *Glomus clarum* sobre el crecimiento y las relaciones hídricas de plantas de tomate afectadas por un ciclo de sequía y recuperación.

Dr.C. J. Dell'Amico, Investigador Titular y Dr.C. P. Rodríguez, Investigador del Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, Cuba; Dr.C. A. Torrecillas, Profesor de Investigación y Dra.C. María de J. Sánchez-Blanco, colaboradora científica del Departamento de Riego y Sanidad del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC) y Dra.C. Asun Morte, Profesora Asistente de la Facultad de Biología de la Universidad de Murcia, España.

✉ amico@inca.edu.cu

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en una cámara de crecimiento con ambiente controlado. La especie utilizada fue *Lycopersicon esculentum* cultivar Amalia. Las semillas fueron sembradas directamente en macetas de 0.5 L de capacidad, que contenían una mezcla de suelo y arena sílice en proporción 1:1 v/v. La mezcla fue previamente autoclaveada para eliminar el posible efecto de endófitos nativos. Este proceso de autoclaveado se realizó a una atmósfera de presión a 100°C durante una hora, tres días, en días alternos.

Antes de efectuar la siembra, al 50 % de las macetas se les aplicaron tres gramos de inóculo certificado de la cepa *Glomus clarum* Nicolson & Schenck (ref. cl 281, colección de INVAM), con el objetivo de establecer la infección micorrizica.

Las condiciones ambientales durante todo el período experimental fueron de 13 horas de fotoperíodo con una radiación fotosintéticamente activa entre 80-250 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Las temperaturas y humedad relativa fueron 25/20°C y 60/70 % durante los períodos luz/oscuridad, respectivamente. Las características químicas del suelo se presentan en la Tabla I.

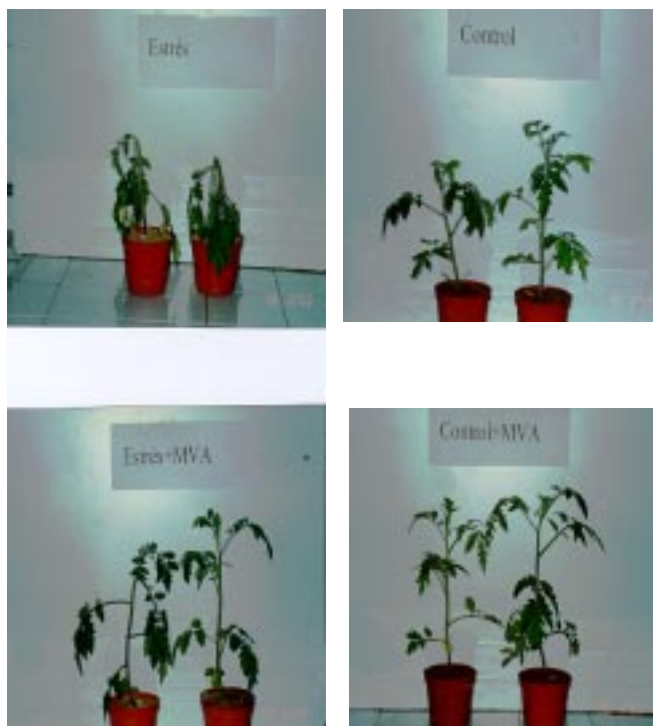
Tabla I. Características químicas del suelo

Materia orgánica	1.70 %
Carbono orgánico total	0.98 %
Nitrógeno total	0.132 %
Relación C/N	7.42
Carbonatos totales	12.14 %
Caliza activa	3.98 %
Fósforo asimilable	196.68 ppm
Cloruros	0.05 meq/100 g
Sulfatos	0.29 meq/100 g
Hierro asimilable	8.51 ppm
Cobre asimilable	1.60 ppm
Manganeso asimilable	42.01 ppm
Zinc asimilable	2.24 ppm

El riego se realizó diariamente de forma manual y con agua corriente. Al alcanzar las plantas el estado fisiológico de siete-ocho hojas verdaderas emitidas, se establecieron los siguientes tratamientos:

- ⇒ Control → C
- ⇒ Control + MVA → C+MVA (plantas inoculadas)
- ⇒ Estrés → E
- ⇒ Estrés + MVA → E+MVA (plantas inoculadas).

El tratamiento de estrés consistió en la suspensión del suministro hídrico a las plantas por espacio de 72 horas, coincidiendo con la aparición visual de síntomas severos de marchitez (ver Fotos). Las evaluaciones de los diferentes indicadores de la infección micorrizogena, el crecimiento, las relaciones hídricas y el intercambio gaseoso, se realizaron en tres momentos: momento 0 (M0) antes de iniciar el tratamiento de estrés, momento 1 (M1) al finalizar el tratamiento de estrés y momento 2 (M2) correspondió a la recuperación de las plantas a las 120 horas de reiniciado el suministro hídrico a las plantas anteriormente estresadas.



Fotos. Comportamiento de las plantas justo en el momento de culminación del estrés hídrico

La determinación del porcentaje de infección en las raíces se realizó mediante un método óptico basado en la técnica de tinción con Azul Trypan (12) y para ello se evaluaron cuatro plantas por tratamiento en cada momento.

La evaluación del crecimiento en masa seca total y las raíces, se realizó mediante secado en estufa a 80°C y se utilizaron cinco plantas por tratamiento en cada momento.

Las medidas del potencial hídrico foliar se efectuaron mediante una cámara de presión del tipo *Scholander* (*Soil Moisture Equipment Co. Santa Barbara. CA, USA*). Las medidas del potencial osmótico y potencial osmótico saturado se realizaron mediante un osmómetro *Wescor 5500* (*vapor pressure osmometer*) y el potencial de turgencia se calculó por la diferencia entre el potencial hídrico y el osmótico. Estas evaluaciones del potencial hídrico y sus componentes fueron hechas al alba y se realizaron cinco repeticiones por tratamiento.

Para las mediciones de conductancia estomática y la tasa fotosintética se utilizó un equipo medidor portátil de fotosíntesis LI-6200 (*Portable Photosynthesis System LI-COR, inc.*); estas se efectuaron en las horas de máxima iluminación y nueve repeticiones por tratamiento en cada momento.

Las medidas de conductividad hidráulica se realizaron al alba y por el método de flujo inducido por presión hidrostática (13), utilizándose un gradiente de presión de 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8 Mpa. El flujo exudado fue normalizado por el área foliar (dm^2) y por la masa seca de las raíces (g), lo que permitió estimar el flujo hídrico por unidad de área foliar (medida funcional de la eficiencia hidráulica) y por unidad de masa seca de la raíz. Estas evaluaciones se realizaron en cuatro plantas por tratamiento.

La conductividad hidráulica (L_p) fue determinada por la pendiente de la regresión lineal obtenida por el ploteo de la presión aplicada frente al flujo hídrico expresada en $\text{mg}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{dm}^{-2}\cdot\text{Mpa}^{-1}$ para el área foliar y en $\text{mg}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{Mpa}^{-1}$ para la masa seca de la raíz.

El área foliar fue medida mediante un equipo *Delta-T area meter* (*Delta-T Devices, Cambridge, England*).

Los tratamientos fueron distribuidos siguiendo un modelo completamente aleatorizado y el tratamiento estadístico de los datos se realizó mediante un análisis de regresión utilizado en la determinación de la conductividad hidráulica individual de cada planta y el cálculo de las medias muestrales y su desviación típica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la evaluación del porcentaje de infección en las raíces en los diferentes momentos se presentan en la Tabla II, donde se pudo apreciar que se alcanzó una infección adecuada para este cultivo, presentando las plantas inoculadas un 34.4 % en M0. También se encontró que al parecer el estrés hídrico produjo un efecto depresivo en la infección micorrizogena, presentándose una reducción del 19 % con respecto al tratamiento C+MVA en M0 y del 24 % en M1 (final del estrés), mientras que en M2 (recuperación) en el tratamiento E+MVA se apreció un incremento de un 14 % de infección con respecto al mismo tratamiento en M1. Esta disminución de la infección en las plantas estresadas puede deberse en lo fundamental a una detención del ritmo metabólico en general provocado por la deficiencia hídrica.

Tabla 2. Porcentaje de infección de las raíces en los tratamientos

T r a t a m i e n t o	M 0	M 1 (%)	M 2
C + M V A	34.4	36.8	37.7
E + M V A		28.0	32.4

Algunos autores (1), trabajando con ocho cepas de hongos micorrizógenos del género *Glomus* en el cultivo de la lechuga, encontraron que el estrés por sequía disminuyó el porcentaje de infección en *G. fasciculatum*, *G. caledonium* y *G. occultum*, se mantuvo igual en *G. intraradices* e incrementó en *G. deserticola*, *G. etunicatum* y *G. mosseae*.

En cuanto al efecto de la micorrización en las variables del crecimiento evaluadas (Figura 1), se encontró que en el área foliar las plantas inoculadas y bien regadas presentaron incrementos en esta variable de 19.5 y 28.9 % con respecto al control en los tres momentos evaluados. Por otra parte, las plantas no micorrizadas y estresadas disminuyeron su área foliar en un 49.7 % con respecto al control, mientras que las inoculadas estresadas disminuyeron solamente un 15.7 % con respecto a las inoculadas bien regadas. Un efecto similar se observó en M2 correspondiente a la recuperación.

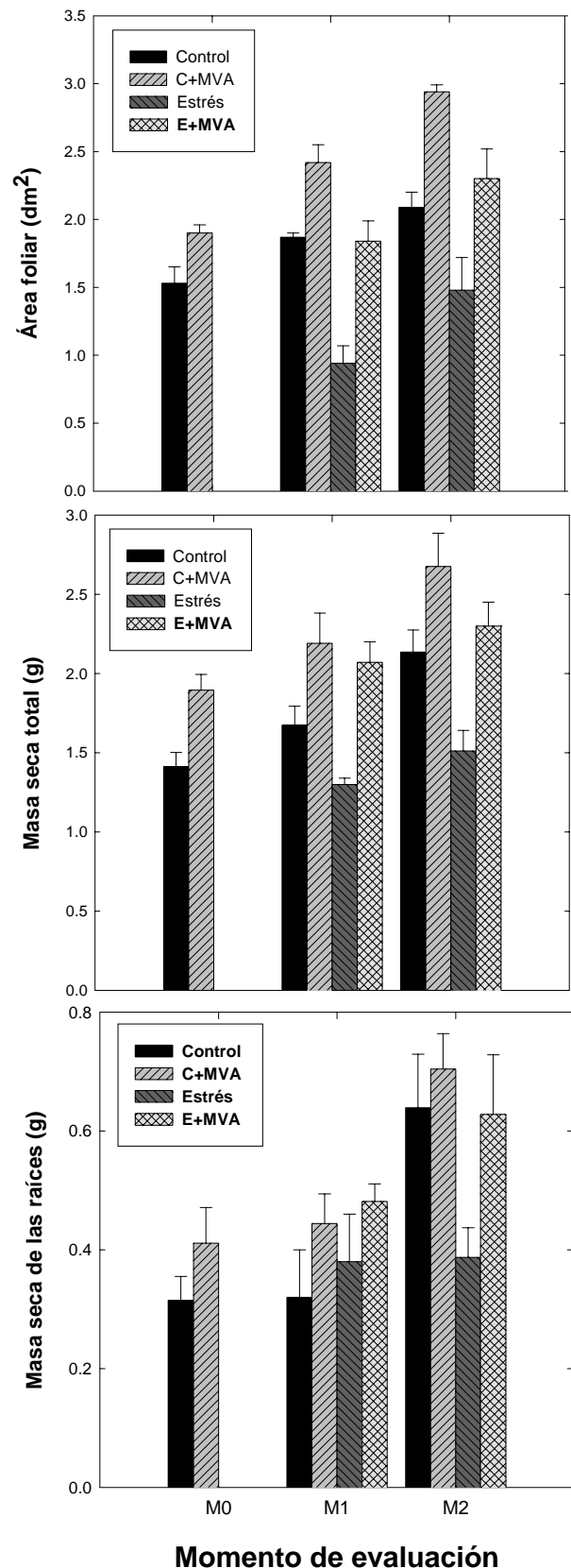


Figura 1. Efecto de la micorrización sobre variables del crecimiento de plantas de tomate en condiciones de estrés hídrico y posterior recuperación

La infección micorrizógena también favoreció significativamente la acumulación de biomasa seca total de las plantas, observándose este efecto tanto en condiciones control, estrés como recuperación. En condiciones control las plantas inoculadas presentaron incrementos entre 20.2 y 25.4 %, las estresadas no inoculadas disminuyeron su biomasa seca total en un 22.1 %, mientras que las inoculadas estresadas presentaron una disminución del 5.5 %. También, se observó un efecto beneficioso de la simbiosis en la recuperación.

Al analizar el efecto de la micorrización en la biomasa seca de las raíces, solamente se apreciaron diferencias significativas a favor de las plantas inoculadas en M2 correspondiente a la recuperación.

Estos resultados demuestran que la micorrización no provoca cambios sustanciales en el crecimiento de las raíces, pero estimula en gran medida el crecimiento en la biomasa seca y el área foliar de las plantas, tanto en condiciones de buen abastecimiento hídrico como de sequía y favorece la recuperación de las plantas cuando se restablece el suministro hídrico.

Efectos similares en este sentido han sido descritos en trabajos anteriores y en diferentes cultivos, donde se señala que la simbiosis hongo-planta es típicamente

mutualista: el hongo depende de la planta para la obtención de fotoasimilados y la planta recibe a cambio una variedad de beneficios que le permite incrementar su crecimiento y mejorar sus relaciones hídricas (14). Por otra parte, se plantea que en condiciones de estrés hídrico, la micorrización juega un papel esencial en activar la difusión de iones y agua hacia las raíces de las plantas hospederas (15), mejorando la nutrición nitrogenada (16, 17, 18) y la absorción de fósforo, lo que permite a las plantas soportar las condiciones de sequía y recuperarse con mayor facilidad.

En la Figura 2 se presenta el comportamiento del potencial hídrico foliar y sus componentes, así como del potencial osmótico saturado ante los tratamientos estudiados, donde se encontró que en M0 las plantas inoculadas presentaron valores mayores de potencial hídrico foliar y potencial de turgencia que las no inoculadas; en M1 (fin del estrés) el mayor efecto de la micorrización se presentó en las plantas afectadas por el estrés hídrico, lo que le permitió a las plantas hospederas mantener valores muy superiores de potencial hídrico foliar y osmótico. En este caso, no se observó un efecto beneficioso de las MVA en el potencial de turgencia en presencia del estrés hídrico, mientras que en las bien regadas sí.

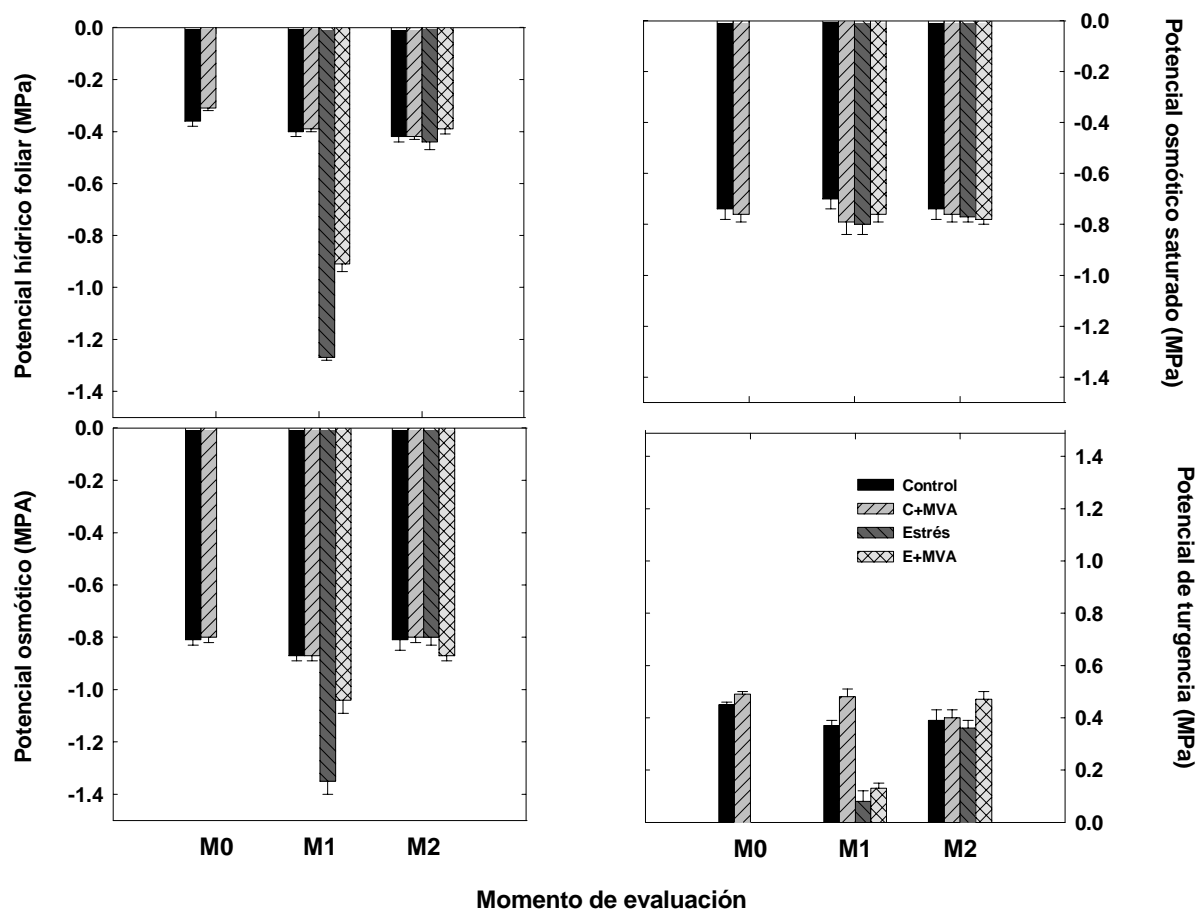


Figura 2. Comportamiento del potencial hídrico foliar y sus componentes en plantas de tomate inoculadas y sin inocular ante condiciones de deficiencia hídrica y recuperación

En cuanto al potencial osmótico saturado no se apreció ningún efecto beneficioso de las MVA, lo que indica la no ocurrencia de ajuste osmótico en las plantas, comportamiento que resulta lógico atendiendo a la agudeza y corta duración del estrés.

En general, estos resultados reflejan que las MVA permitieron en cierta medida una mejor alimentación hídrica de las plantas hospederas, tanto en condiciones de buen abastecimiento hídrico como de sequía, lo que se debe fundamentalmente a que los hongos micorrizógenos pueden incrementar la absorción de agua por las raíces (19), favoreciendo indirectamente la conductividad de las raíces al flujo de agua (4), transportando directamente el agua hacia las raíces infectadas. Por otra parte, también se señala que las MVA favorecen la adaptación de las plantas al estrés hídrico (20).

También otros autores demostraron que las hifas extrarradicales permiten un mejor contacto entre las raíces y el suelo durante el estrés hídrico, facilitando la absorción de agua (21).

Las MVA produjeron un efecto beneficioso significativo sobre las variables conductancia estomática y tasa fotosintética (Figura 3), comportamiento que se manifestó en los tres momentos evaluados y en presencia o ausencia de deficiencia hídrica.

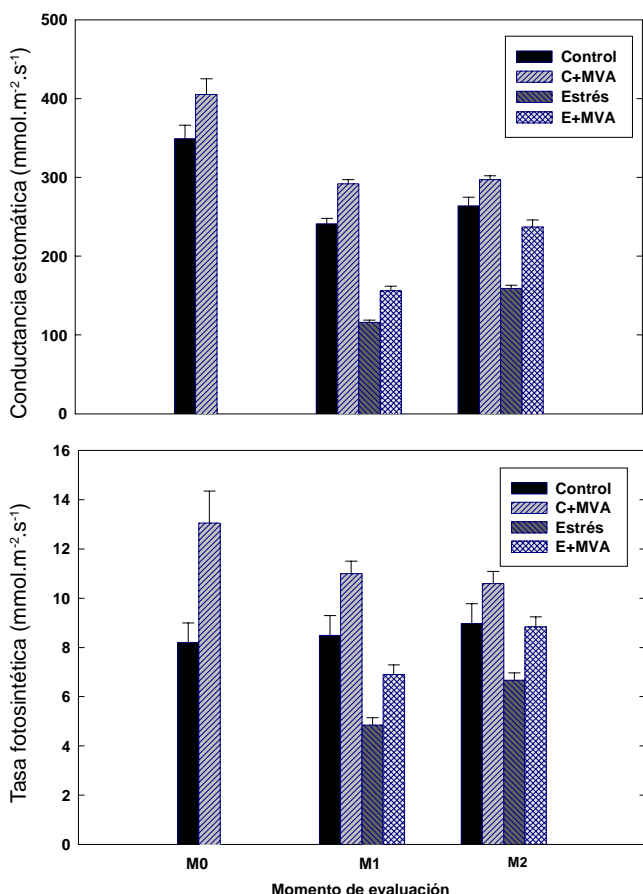


Figura 3. Intercambio gaseoso de plantas de tomate micorrizadas y no micorrizadas en condiciones de estrés hídrico y recuperación

Resulta evidente que la infección micorrizica de las raíces tiene un efecto marcado sobre el comportamiento estomático de las hojas de las plantas hospederas (22), lo que también favorece el intercambio de CO₂.

Estos resultados tienen una gran importancia científica y práctica, debido a que el incremento de la asimilación de CO₂ se considera como una estrategia de las plantas para la tolerancia al estrés por sequía. De igual manera, cambios en la conductancia estomática (23) y en la transpiración han sido reconocidos como mecanismos por los cuales las plantas micorrizadas incrementan su resistencia al estrés hídrico, lo que puede permitir la selección de hongos más efectivos (1).

Al analizar los resultados del comportamiento de la conductividad hidráulica de las raíces por unidad de masa seca de la raíz y por unidad de área foliar (como medida funcional de la eficiencia hidráulica) (Figura 4), se encontró un incremento significativamente notorio de la conductividad hidráulica de las raíces por unidad de masa seca en las plantas inoculadas en los tres momentos evaluados y tanto ante condiciones de estrés hídrico o no, mientras que en el caso de la conductividad por unidad de área foliar, el efecto beneficioso de las HVA solamente se manifestó cuando las plantas fueron bien abastecidas de agua.

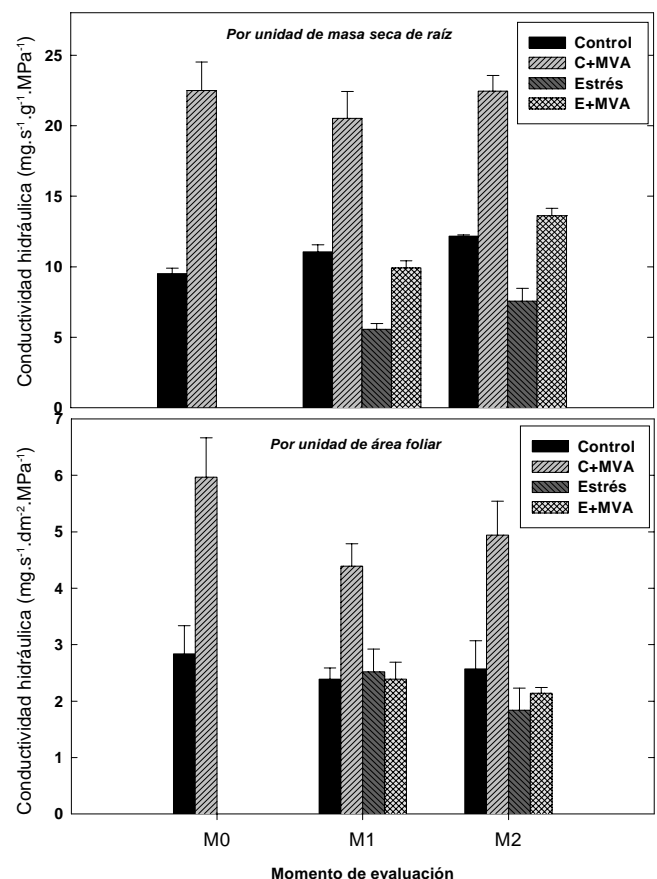


Figura 4. Efecto de la micorrización sobre la conductividad hidráulica (Lp) de plantas de tomate ante condiciones de sequía y posterior recuperación

Estos resultados sugieren que evidentemente las MVA favorecen en gran medida la capacidad de las raíces para conducir el agua a través de ellas, incluso ante condiciones de estrés hídrico. Sin embargo, también se manifiesta que la deficiencia hídrica al parecer afecta otros procesos fisiológicos que limitan la eficiencia hidráulica de las plantas aún cuando estas sean inoculadas con MVA.

Varios estudios realizados en esta temática sugieren que las raíces infestadas por hongos micorrizógenos pueden alcanzar tasas específicas de absorción de agua (volumen de agua absorbida por unidad de longitud de raíz) superiores a las de las raíces no infectadas, independientemente del transporte de agua directo que tiene lugar a través de las hifas (4), lo que puede atribuirse a una demanda transpiracional mayor de las plantas hospederas y/o una conductividad hidráulica superior de las raíces micorrizadas. También es posible que la mayor absorción hídrica específica de las plantas micorrizadas pueda estar relacionada con alteraciones morfológicas de las raíces (19).

En general, los resultados han demostrado que la infección micorrizógena de las raíces produjo un efecto beneficioso en la alimentación hídrica de las plantas, lo que se manifestó a través de una mayor conductividad hidráulica de las raíces por unidad de masa seca; esto favoreció considerablemente la conductancia estomática y por tanto una mayor tasa fotosintética. Todo esto se vio reflejado en un mayor crecimiento en biomasa seca de la parte aérea de las plantas y en el área foliar.

Por otra parte, también las plantas inoculadas sufrieron en menor cuantía los efectos de la deficiencia hídrica y presentaron una recuperación más rápida en comparación con las no inoculadas.

REFERENCIAS

1. Ruíz-Lozano, J. M.; Azcón, R. y Gómez, M. Effects of arbuscular-mycorrhizal *Glomus* species on drought tolerance: physiological and nutritional plant responses. *Appl Environ Microbiol.*, 1995, vol. 61, p. 456-460.
2. Aguilera-Gómez, L.; Davies, F. T.; Olalde-Portugal, V.; Duray, S. A. y Phavaphutanon, L. Influence of phosphorus and endomycorrhiza (*Glomus intraradices*) on gas exchange and plant growth of chile ancho pepper (*Capsicum annuum* L. C.V. San Luis). *Photosynthetica*, 1999, vol. 36, p. 441-449.
3. Davies, F. T. Jr.; Durray, S. A.; Phavaphutanon, L. y Stahl, R. S. Phosphorus influence on gas exchange and plant growth and development of two morphologically distinct types of *Capsicum annuum*. *Photosynthetica*, 1999, vol. 36, p. 9-106.
4. Koide, R. T. Physiology of the mycorrhizal plant. En: Tommerup IC. (ed.): *Advances in Plant Pathology, Mycorrhiza synthesis*. New York. Academic Press, 1993, t 9, p. 33-54.
5. Davies, F. T.; Svenson, S. E.; Cole, J. C.; Phavaphutanon, L.; Durray, S. A.; Olalde-portugal, V.; Meier, C. E. y Bos, S. H. Non-nutritional stress acclimation of mycorrhizal woody plants exposed to drought. *Tree Physiol.*, 1996, vol. 16, p. 985-993.
6. Schwob, I.; Ducher M.; Sallanon, H. y Coudret, A. Growth and gas exchange responses of *Hevea brasiliensis* seedlings to inoculation with *Glomus mosseae*. *Trees*, 1998, vol. 12, p. 236-240.
7. Augé, R. M. Stomatal behavior of arbuscular mycorrhizal plants. En: *Arbuscular mycorrhizas: physiology and function*, Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers, 2000, p. 201-237.
8. Duan, X.; Neuman, D. S.; Reiber, J. M.; Green, C. D.; Saxton, A. M. y Augé, R. M. Mycorrhizal influence on hydraulic and hormonal factors involved in the control of stomatal conductance during drought. *J. Exp. Bot.*, 1996, vol. 47, p. 1541-1550.
9. Ebel, R. C.; Duan, X.; Still, D. W. y Augé, R. M. Xylem sap abscisic concentration and stomatal conductance of mycorrhizal *Vigna unguiculata* in drying soil. *New Phytol.*, 1997, vol. 135, p. 755-761.
10. Danneberg, G.; Latus, C.; Zimmer, W.; Hundeshagen, B.; Scheneider-Poetsch, H. y Bothe, H. Influence of vesicular-arbuscular mycoorrhiza on phytohormone balances in maize (*Zea mays* L.). *J. Plant Physiol.*, 1992, vol. 141, p. 33-39.
11. Croker, J. L.; Witte, W. T. y Augé, R. M. Stomatal sensitivity to nonhydraulic root-to-shoot signals of partial soil drying in six temperate, deciduous forest trees. *J. Exp. Bot.*, 1998, vol. 49, p. 761-774.
12. Phillips, J. M. y Hayman, D. S. Improved procedures for clearing and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 1970, vol. 55, p. 158-161.
13. Huxman, K. A.; Smith, S. D. y Neuman, D. S. Root hydraulic conductivity of *Larrea tridentata* and *Helianthus annuus* under elevated CO₂. *Plant, Cell Environment*, 1999, vol. 22, p. 325-330.
14. Davies, F. T.; Potter, J. R. y Linderman, R. G. Drought resistance of mycorrhizal pepper plants independent of leaf P-concentration-response in gas exchange and water relations. *Physiol Plantarum*, 1993, vol. 87, p. 45-53.
15. Faber, B. A.; Zasoski, R. J.; Munns, D. N. y Shackel, K. A method for measuring hyphal nutrient and water uptake in mycorrhizal plants. *Canadian Journal of Botany*, 1991, vol. 69, p. 87-94.
16. Smith, S. E. y Read, D. J. *Mycorrhizal symbiosis*, 2. ed. New York. Academic Press, 1997. 605 p.
17. Subramanian, K. S.; Charest, C.; Dwyer, L. M. y Hamilton, R. I. Effects of arbuscular mycorrhizae on leaf water potential. Sugar content and P content during drought and recovery of maize. *Can. J. Bot.*, 1997, vol. 75, p. 1582-1591.
18. Amora-Lazcano, E.; Vázquez, M. M. y Azcón, R. Response of nitrogen-transforming microorganisms to arbuscular mycorrhizal fungi. *Biol. Fertil. Soils.*, 1998, vol. 27, p. 65-70.
19. Bryla, D. R. y Duniway, J. M. Growth, phosphorus uptake and water relations of sunflower and wheat infected with an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytol.*, 1997, vol. 136, p. 581-590.
20. Subramanian, K. S.; Charest, C.; Dwyer, L. M. y Hamilton, R. I. Arbuscular mycorrhizas and water relations in maize under drought stress at tasseling. *New Phytol.*, 1995, vol. 129, p. 643-650.
21. Davies, F. T.; Potter, J. R. y Linderman, R. G. Micorrhiza and repeated drought exposures affect drought resistance and extraradical hyphae development of pepper plants independent of plant size and nutrient content. *J. Plant Physiol.*, 1992, vol. 139, p. 289-294.
22. Goicoechea, N.; Antolín, M. C. y Sánchez-Díaz, M. Gas exchange is related to the hormone balance in mycorrhizal or nitrogen-fixing alfalfa subjected to drought. *Physiol. Plantarum*, 1997, vol. 100, p. 987-997.
23. Augé, R. M. y Duan, X. Mycorrhizal fungi and nonhydraulic root signal of soil drying. *Plant Physiol.*, 1991, vol. 97, p. 821-824.

Recibido: 9 de octubre del 2001

Aceptado: 3 de diciembre del 2001