

# Caracterización de la variabilidad genética de cepas de *Pseudomonas* spp. patógenas en arroz

## Genetic variability characterization of rice pathogenic strains of *Pseudomonas* spp.



CU-ID: 2247/v37n1e10

<sup>1</sup>[Deyanira Rivero González](#), <sup>2</sup>[Odaylin Plasencia Márquez](#), <sup>1</sup>[Ariel Cruz Triana](#),  
<sup>2</sup>[Mylene Corzo López](#), <sup>2</sup>[Benedicto Martínez Coca](#), <sup>2</sup>[Yamila Martínez Zubiaur](#)

<sup>1</sup>Unidad Científico Tecnológica de Base “Los Palacios”, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA): Carretera a Tapaste, km 3 ½, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

<sup>2</sup>Dirección de Sanidad Vegetal, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Carretera Tapaste y Autopista Nacional, Km 23 ½ Apartado 10, CP. 32 700, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

**RESUMEN:** El objetivo de este trabajo fue caracterizar la variabilidad genética de cepas de *Pseudomonas* spp. causantes de la Pudrición parda de la vaina en arroz, en Cuba, mediante el análisis de regiones genómicas. Se realizó un primer agrupamiento basado en el análisis de la huella genética mediante PCR. Posteriormente, se desarrolló el análisis a través de rep-PCR (ERIC, BOX y REP-PCR). En los dos tipos de ensayos las cepas mostraron variabilidad molecular, lo que se evidenció por la formación de tres grupos de *Pseudomonas* que circulan en el país. El primer grupo estuvo conformado por las cepas A74 y A75, el segundo incluyó las cepas A90 y A91, y el último relacionó la mayoría de las cepas (A9, A36, A63, PR1 y PR3); estas últimas se identificaron como *Pseudomonas* sp. o *Pseudomonas fluorescens*.

**Palabras clave:** BOX-PCR, ERIC-PCR, *Oryza sativa*, *Pseudomonas* sp., REP-PCR.

**ABSTRACT:** The objective of this work was to characterize the genetic variability of strains of *Pseudomonas* spp. that cause Sheath Brown Rot of rice in Cuba, through the analysis of genomic regions. A first grouping was performed based on the genetic fingerprint analysis by PCR, and then the analysis was developed through rep-PCR (ERIC, BOX and REP-PCR). In the two types of tests, the strains showed molecular variability, which was evidenced by the formation of three groups of *Pseudomonas* that circulate in the country. One of them grouped the strains A74 and A75, the second group included the strains A90 and A91, and the last group related most of the strains (A9, A36, A63, PR1 and PR3), the latter identified as *Pseudomonas* sp. or *Pseudomonas fluorescens*.

**Keywords:** BOX-PCR, ERIC-PCR, *Oryza sativa*, *Pseudomonas* sp., REP-PCR.

### INTRODUCCIÓN

Diversas enfermedades afectan el cultivo del arroz a nivel mundial y, aunque predominan las causadas por especies de hongos, las de origen bacteriano se destacan por su impacto económico y su amplia distribución (1, 2). En las últimas décadas, algunos agentes bacterianos han causado enfermedades emergentes, como *Burkholderia glumae* (Kurita y Tabei) (3) y especies de *Pseudomonas*, entre ellas *P. syringae* Van Hall y, particularmente, *P. fuscovaginae* Miyajima, Tani y Akita, asociados a la Pudrición de la vaina y el manchado del grano (4, 5).

Las especies del género *Pseudomonas* poseen una gran versatilidad metabólica, heterogeneidad y plasticidad genética (6, 7), lo cual favorece su adaptación a disímiles condiciones y dificulta su detección y manejo. De ahí la importancia de la caracterización molecular de las mismas.

Para los estudios de tipificación o de diversidad genética dentro del género *Pseudomonas*, se utilizan técnicas como Rep-PCR (del inglés “repetitive

sequence”), que incluye los protocolos conocidos como REP-, ERIC- y BOX-PCR (del inglés “repetitive extragenic palindromic sequences, enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences” y elementos BOX, respectivamente), en dependencia de las regiones conservadas y distribuidas en el genoma bacteriano a las que se unan los iniciadores aplicados. También se usan RAPDs-PCR (del inglés “randomly amplified polymorphic DNA”), PCR-ribotyping, MLST (del inglés “multilocus sequence typing”) de secuencias concatenadas de genes conservados (fundamentalmente *rpoD*, *rpoB*, *gyrB* y 16S rRNA), entre otras (8, 9, 10).

Una investigación basada en la técnica BOX-PCR, demostró la presencia de patrones polimórficos intraespecíficos para cepas aisladas de semillas de arroz en Filipinas (11). Posteriormente, al comparar diferentes aislados de *Pseudomonas* procedentes de Filipinas, con cepas de referencia provenientes de Japón y de Burundi, y con otras especies de este género (*P. syringae* pv. *syringae*, *P. putida* bv. A), se distinguieron dos grupos, el de los aislados del trópico y el de las cepas de referencia (12).

\*Correspondencia a: [Deyanira Rivero González](mailto:Deyanira Rivero González). E-mail: [deyanira@inca.edu.cu](mailto:deyanira@inca.edu.cu)

Recibido: 14/10/2021

Aceptado: 21/03/2022

En Cuba, se informó la presencia de especies de *Pseudomonas* causantes de Pudrición de la vaina en las tres principales regiones productoras de arroz. Esta pudriera ser una de las causas que inciden en los bajos rendimientos de este cereal, cuyo promedio no supera las 3,57 t.ha<sup>-1</sup> (13), a pesar de las estrategias para fomentar su producción.

Sin embargo, no se conoce si existe variabilidad genética en la población de cepas identificadas en el país, por lo que el objetivo de este trabajo fue caracterizar la variabilidad genética de cepas cubanas de *Pseudomonas* spp., patógenas al cultivo del arroz, mediante el análisis de regiones genómicas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se desarrolló con las cepas A9, A36, A63, A74, A75, A90, A91, PR1 y PR3, pertenecientes al cepario del Laboratorio de Bacteriología Vegetal del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), en el cual se realizaron los ensayos correspondientes. Las cepas puras se obtuvieron a partir de aislamientos de vainas y granos de arroz infectados, procedentes de las provincias Granma, Sancti Spiritus y Pinar del Río. Se procedió a la extracción de ADN genómico de las cepas mediante la inoculación de tubos de ensayo contentivos de 5 mL de medio Caldo Nutriente (BIOCEN), con 500 µL de suspensiones bacterianas de cada cepa en solución salina estéril (SSE), ajustadas a la concentración de 1×10<sup>9</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. A continuación se incubaron, en agitación, a 28°C y oscuridad, durante 16-18 h. Posteriormente, se tomaron alícuotas de 1 mL, se centrifugaron a 10 000 rpm, durante 2 min (14), y el precipitado se resuspendió en 200 µL de SSE. La extracción de ADN genómico se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Dellaporta *et al.* (15). Los estudios de caracterización molecular consistieron en el análisis de la huella genética mediante PCR con cebadores descritos por Onasanya *et al.* (16) y rep-PCR.

### Análisis de la huella genética mediante PCR

Las cepas se analizaron mediante una PCR con los cebadores P<sub>f</sub>F3 (5'-AACGGGTGACTTGGT-CAGG-3') y P<sub>r</sub>R3 (5'-CTCCGAGATTACCCA-CAAGC-3') (16).

La mezcla de PCR se realizó con 50 ng de ADN genómico de cada una de las cepas, 0,2 µM de cada cebador y *IX GoTaq G2 Green Master Mix* (Promega, EUA): *IX Green GoTaq G2 Reaction Buffer* (pH 8,5); 0,2 mM de dNTPs; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> y 1 U de Taq ADN polimerasa; en un volumen total de 25 µL. Como control negativo se utilizó agua desionizada estéril. La amplificación se realizó con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 94°C durante 3 min, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento a 55°C durante 1 min y extensión a 72°C, 2 min, con una extensión final a 72°C por 7 min, en un termociclador Eppendorf Mastercycler.

Los productos de amplificación se separaron en un gel de agarosa (1 %), mediante una corrida electroforética (tampón Tris-Ácido bórico-EDTA 0,5 X teñido con bromuro de etidio) a 100 V, durante 30 min (17). Los amplicones se visualizaron en un transiluminador de luz UV Syngene InGenius L (Syngene, EE. UU). Se utilizó el marcador de peso molecular de 1 Kb (Ladder, Promega).

### Análisis de la huella genética mediante rep-PCR

Para el desarrollo de este ensayo se utilizaron los cebadores descritos por Ravi *et al.* (14) (Tabla 1).

La mezcla de reacción para la PCR (volumen final de 20 µL) consistió en *IX GoTaq G2 Green Master Mix* (Promega, EUA): (*IX Green GoTaq G2 Reaction Buffer* (pH 8,5); 0,2 mM de dNTPs; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> y 1 U de Taq ADN polimerasa); 0,5 µM de cada cebador y 5-50 ng de ADN genómico bacteriano. Como control negativo se utilizó agua desionizada estéril en lugar de ADN. Las reacciones se desarrollaron en un termociclador programable Master Cycler (Eppendorf, Alemania), de acuerdo al programa descrito por Ravi *et al.* (14). El mismo consistió en una desnaturalización inicial a 94°C por 3 min; 45 ciclos de desnaturalización a 94°C por 25 s, alineamiento a 52°C (para BOX y ERIC-PCR) o a 38°C (para REP-PCR) durante 1 min, y extensión a 72°C por 1 min; seguido de una extensión final a 72°C durante 8 min.

Se realizaron tres réplicas de los ensayos de rep-PCR, con tres conjuntos de ADN genómico de las cepas bacterianas. La corrida electroforética se realizó según se refirió previamente, pero en un gel de agarosa (1,2 %), durante 2 h y 50 min.

**Tabla 1.** Cebadores usados en rep-PCR para el análisis de la huella genética de cepas patógenas/  
*Primers used in rep-PCR for the analysis of the genetic fingerprinting of pathogenic strains.*

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Número de bases
BOX AIR	CTACGGCAAGGCGACGCTGACG	22
ERIC F	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	22
ERIC R	TGTAAGCTCCTGGGGATTAC	21
REP F	ICGICTTATCIGGCCTAC	18
REP R	IIICGICGICATCIGGC	18

I: Inosina

Para cada cepa, se registraron los perfiles genéticos consistentes que se visualizaron en las repeticiones. Con estos datos se realizó una matriz binaria donde se asignó “1” a la presencia y “0” a la ausencia de cada una de las bandas y se analizó su similitud genética mediante el método UPGMA, distancia de Jaccard, contenido en el Programa NTSYSpc21 versión 2.11. Los dendrogramas obtenidos sirvieron como base para evaluar la variabilidad molecular de las cepas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Análisis de la huella genética mediante PCR

Se obtuvo amplificación de bandas con tres patrones diferentes: una banda común, de aproximadamente 700 pb (única en las cepas A9, A36, A63, PR1 y PR3), una banda adicional para A74 y A75 de más de 1000 pb, y un total de cuatro bandas para A90 y A91. Esto evidencia la presencia de, al menos, tres perfiles genéticos diferentes entre las cepas cubanas causantes de la pudrición de la vaina (Figura 1). Las cepas A74 y A75 mostraron iguales perfiles, lo cual sugiere que se trata de una misma especie.

Onasanya *et al.* (16) también identificaron tres perfiles diferentes, aunque obtuvieron 23 fragmentos, en una PCR utilizando los cebadores P<sub>f</sub>F3 y P<sub>f</sub>R3. Estos autores indicaron la conveniencia de la aplicación de la PCR, con estos cebadores, para el análisis de numerosas muestras, lo que permite mayor eficiencia en el estudio de la virulencia y del movimiento de las poblaciones de patógenos bacterianos en el cultivo del arroz.

### Análisis por rep-PCR

El número de bandas amplificadas, para cada cepa, varió desde 3 hasta 11 con los juegos de cebadores de rep-PCR. La talla de los fragmentos de ADN amplificados osciló entre 200 y 4000 pb. Para la población de cepas analizadas, se obtuvieron 60 bandas de ADN en

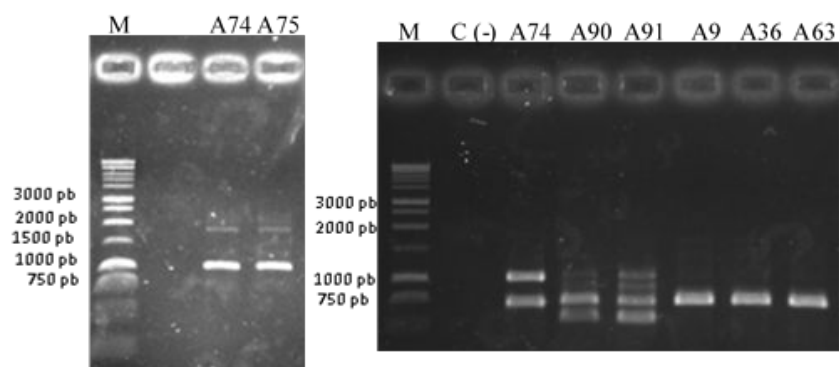
los tres ensayos (ERIC, BOX y REP-PCR): 28, 13 y 19 por cada uno de estos, respectivamente.

Sobre la base del análisis por rep-PCR (Figura 2), se distinguieron fundamentalmente tres grupos. El primero comprendió las cepas A9, A36, A63, PR1 y PR3; el segundo, las cepas A74 y A75 y el tercero, A90 y A91. La similitud entre las cepas del primer grupo fue superior al 55 % y alcanzó el 100 % para las cepas A36 y A63 en los tres ensayos.

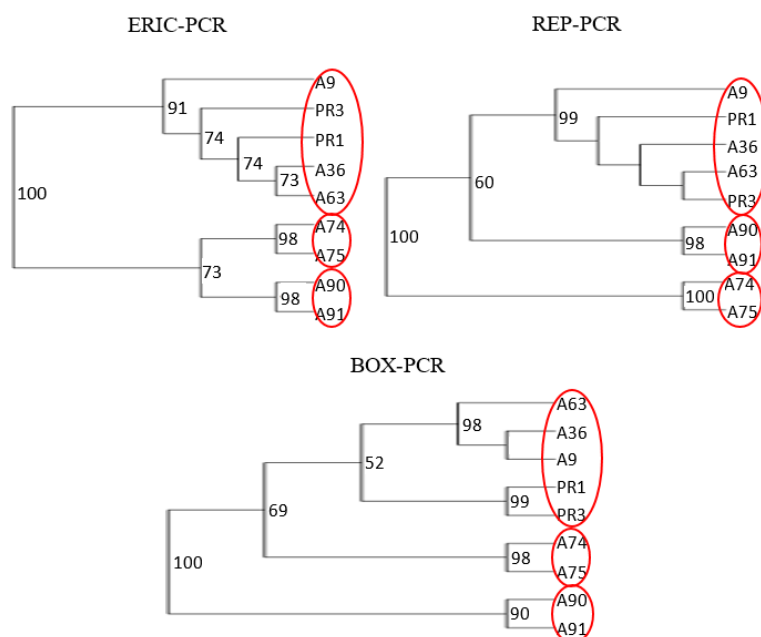
Las cepas A74 y A75 exhibieron una similitud de 80 % para ERIC-PCR y 100 % para REP y BOX-PCR; mientras que, entre las cepas A90 y A91, osciló entre el 75 y el 100 %; entre estos dos grupos de 0 (por REP-PCR) hasta 44 % (por BOX-PCR). Algunas de las cepas mostraron bandas únicas (como A9 y PR3 en el ensayo ERIC-PCR, A90 en BOX-PCR, y PR1 en REP-PCR), lo que indica la capacidad de esta técnica para diferenciar entre cepas.

Estos resultados corroboraron que existe variabilidad genética entre las cepas estudiadas, como se demostró en el ensayo previo de PCR. De igual forma, se informó alta variabilidad molecular entre cepas procedentes de Filipinas, al compararlas con cepas de referencia de Japón y de Burundi (12).

En los dos tipos de ensayos evaluados, las cepas A9, A36, A63, A74, A75, A90, A91, PR1 y PR3 mostraron variabilidad molecular, lo que evidencia la presencia de tres grupos de *Pseudomonas* que circulan en el país. Uno de ellos estuvo conformado por A74 y A75. El segundo grupo incluyó las cepas A90 y A91, que compartieron un polimorfismo similar en los análisis genómicos realizados. Algunos autores analizaron poblaciones de *Pseudomonas* infectando arroz, con diversidad metabólica, plasticidad del genoma y adaptación funcional, lo que les posibilita, incluso, estar presentes en diferentes nichos ecológicos (18). Las cepas A9, A36, A63, PR1 y PR3, ubicadas en el último grupo, muestran patrones polimórficos muy similares entre ellas y se pueden clasificar como *Pseudomonas* sp. o *P. fluorescens*, aunque son patógenas al cultivo del arroz. En este sentido, existen informes de cepas de *P. fluorescens* que pueden ser patógenas ocasiona-



**Figura 1.** Perfiles genéticos generados de la amplificación de las cepas causantes de pudrición de la vaina de arroz, utilizando los cebadores específicos P<sub>f</sub>F3 y P<sub>f</sub>R3. Electroforesis en gel de agarosa al 1 %. M: Patrón de Peso Molecular 1 Kb (Promega) / Genetic profiles generated from the amplification with the specific primers P<sub>f</sub>F3 and P<sub>f</sub>R3 of the strains causing rice sheath rot, Electrophoresis in 1 % agarose gel. M: Molecular Weight Standard 1 Kb (Promega)



**Figura 2.** Dendrograma que demuestra el agrupamiento de las cepas causantes de pudrición de las vaina y manchado del grano, a partir de los perfiles genéticos generados por los cebadores ERIC, BOX y REP-PCR. El análisis de conglomerados (FreeTree, Treeview) se realizó por el método UPGMA (Distancia Jaccard). / Dendrogram showing the grouping of the strains causing sheath rot and grain discoloration, from the genetic profiles generated by ERIC, box and REP-PCR primers. The cluster analysis (FreeTree, Treeview) was performed using the UPGMA (Jaccard Distance) method.

les de numerosos cultivos, entre ellos: arroz, trigo, maíz, sorgo, papa, ajo, pepino, algodón, tomate, tabaco, frijol y cítricos (19, 20, 21).

No obstante, se requiere profundizar en los estudios de variabilidad y diagnóstico de la enfermedad de la Pudrición parda de la vaina en el país, con un enfoque polifásico, y donde se aborden estudios taxonómicos o de caracterización mediante técnicas moleculares, como la PCR con cebadores específicos o la detección múltiple de las principales especies relacionadas con esta enfermedad (3, 22, 23) y la secuenciación de genes conservados independientes o concatenados: ARNr 16S, *rpoB*, *rpoD-gyrB*, *atpD-carA-recA*-ARNr 16S (18, 24), entre otras (8, 25). En tal sentido, Quibod *et al.* (18) detectaron eventos de inserción-delección en el genoma de cepas de *Pseudomonas* que permiten una alta frecuencia de intercambio genético, e influyen en la variación genética intrínseca, lo que hace que las cepas, con alta similitud entre ellas, representen grupos filogenéticos diferentes, evidenciando que el estatus filogenético de estas cepas necesita ser analizado en el contexto de metapoblaciones.

## CONCLUSIONES

De acuerdo con la variabilidad genética obtenida de las regiones genómicas estudiadas, circulan en Cuba tres grupos de cepas de *Pseudomonas* spp.: el primero conformado por A74 y A75, el segundo por A90 y A91, y el tercer grupo incluyó cepas de *Pseudomonas* sp. o *Pseudomonas fluorescens* (A9, A36, A63, PR1 y PR3); asimismo, se confirmó la necesidad de continuar la identificación a nivel de especie.

## REFERENCIAS

- Martínez S, Bao L, Escalante F. Manual de Identificación de Enfermedades y Plagas en el Cultivo del Arroz. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria Uruguay. Boletín de divulgación. 2018;116:66 p.
- Pérez HI, Rodríguez I, García RM. Principales enfermedades que afectan al cultivo del arroz en Ecuador y alternativas para su control. Revista Científica Agroecosistemas. 2018; 6(1):16-27.
- Pedraza LA, Bautista J, Uribe-Vélez D. Seed-borne *Burkholderia glumae* infects rice seedling and maintains bacterial population during vegetative and reproductive growth stage. Plant Pathol. J. 2018; 34(5):393-402.
- CABI. *Pseudomonas syringae* pv. *oryzae* (halo blight). Invasive Species Compendium. 2019; Wallingford, UK: CAB International. <https://www.cabi.org/isc/datasheet/44981>
- Musonerimana S, Bez C, Licastro D, Habarugira G, Bigirimana J, Venturi V. Pathobiomes Revealed that *Pseudomonas fuscovaginae* and *Sarocladium oryzae* Are Independently Associated with Rice Sheath Rot. Microbial Ecology. 2020; <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01529-2>
- Alam K, Islam M, Li C, Sultana S, Zhong L, Shen Q, *et al.* Genome Mining of *Pseudomonas* Species; Diversity and Evolution of Metabolic and Biosynthetic Potential. Molecules. 2021; 26:7524. <https://doi.org/10.3390/molecules26247524>

7. Yi B, Dalpke AH. Revisiting the intrageneric structure of the genus *Pseudomonas* with complete whole genome sequence information: Insights into diversity and pathogen-related genetic determinants. *Infections, Genetics and Evolution*. 2022; 97. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.105183>
8. Peix A, Ramírez ME, Velázquez BE. The current status of *Pseudomonas* revisited: An update. *Infection, Genetics and Evolution*. 2018; 57:106-116.
9. He R, Liu P, Jia B, Xue S, Wang X, Hu J, *et al.* Genetic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* strains from different geographic regions in China. *Phytopathology*. 2019; 109(3):347-357.
10. Abdel-Rhman S, Rizk DE. Comparative assessment of different PCR-based typing methods of *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Infection and drug resistance*. 2021; 14:1019-1035.
11. Cottyn B, Regalado E, Lanoot B, De Cleene M, Mew TW, Swings J. Bacterial populations associated with rice seed in the tropical environment. *Phytopathology*. 2001;91(3):282-92.
12. Cottyn B, Barrios H, George T, Vera-Cruz CM. Characterization of rice sheath rot from Siniloan, Philippines. *Int Rice Res Notes*. 2002;27(1):39-40.
13. ONEI. Oficina Nacional de Estadística e Información. Anuario Estadístico de Cuba 2020. Capítulo 9: Agricultura, ganadería, silvicultura y pesca. Edición 2021. [En línea]. [Consultado: 28 de enero de 2022]. Disponible en: <http://www.onei.gob.cu/node/16275>
14. Ravi A, Prathap V, Narayana P, Sokka S, Sivaramakrishnan S. Assessment of Genetic Diversity in *Pseudomonas fluorescens* using PCR-based Methods. *Bioremediation, Biodiversity and Bioavailability*. 2011; 5(1):10-16.
15. Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB. A plant DNA miniprep: version II. *Plant molecular biology reporter*. 1983; 1(4):19-21.
16. Onasanya A, Basso A, Somado E, Gasore ER, Nwilene FE, Ingelbrecht I, *et al.* Development of a combined molecular diagnostic and DNA fingerprinting technique for rice bacteria pathogens in Africa. *Biotechnology*. 2010; 9(2):89-105.
17. Sambrook J, Fritsch ER, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.). 1989. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
18. Quibod IL, Grande G, Oreiro EG, Borja FN, Dossa GS, Mauleon R, *et al.* Rice-Infecting *Pseudomonas* Genomes Are Highly Accessorized and Harbor Multiple Putative Virulence Mechanisms to Cause Sheath Brown Rot. *PLoS ONE*. 2015; 10(9):e0139256.
19. CABI. *Crop Protection Compendium* [CD-Rom]. 2006. Wallingford, Londres: CABI.
20. Viteri A, Regalado H, Toaza A. Identificación de *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas marginalis*, causantes del síndrome del peridermo "Pink Eye" en papa. *Revista Científica Ecuatoriana*. 2020; 7(2):49-59.
21. Beiki F, Busquets A, Gomila M, Rahimian H, Lalucat J, García E. New *Pseudomonas* spp. Are Pathogenic to Citrus. *PLoS ONE*. 2016; 11(2):e0148796.
22. Aflaha I, Chairul J, Baharuddin A, Kuswinanti T. Molecular identification of bacteria causing grain rot disease on rice. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2020;486:012165. doi:[10.1088/1755-1315/486/1/012165](https://doi.org/10.1088/1755-1315/486/1/012165)
23. Bangratz M, Wonni I, Kini K, Sondo M, Brugidou C, Béna G, *et al.* Design of a new multiplex PCR assay for rice pathogenic bacteria detection and its application to infer disease incidence and detect co-infection in rice fields in Burkina Faso. *PLoS ONE*. 2020; 15 (4): e0232115. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232115>
24. Ogier JC, Pages S, Galan M, Barret M, Gaudriault S. *rpoB*, a promising marker for analyzing the diversity of bacterial communities by amplicon sequencing. *BMC Microbiology*. 2019; 19(171):16 p.
25. Musonerimana S, Venturi V. The rice sheath rot pathogen *Pseudomonas fuscovaginae*; microbiome and cell-cell signaling studies. [PhD Thesis in Molecular Biology]. 2020; 156 p. [En línea]. [Consultado: 16 de febrero de 2022]. Disponible en: [https://iris.sissa.it/retrieve/handle/20.500.1176/7/112329/124405/Samson\\_Thesis\\_2020.pdf](https://iris.sissa.it/retrieve/handle/20.500.1176/7/112329/124405/Samson_Thesis_2020.pdf)

**Declaración de conflicto de intereses:** Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

**Contribución de los autores:** **Deyanira Rivero González:** Conceptualización, investigación, escritura del borrador original, Redacción, revisión y edición. **Odaylin Plasencia Márquez:** Investigación. **Ariel Cruz Triana:** Investigación. **Mylene Corzo López:** Investigación, metodología, curación de datos. **Benedicto Martínez Coca:** Investigación, revisión del artículo. **Yamila Martínez Zubiaur:** Supervisión, Metodología, visualización, Redacción, revisión y edición.

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/)