

PROTOCOLO PARA CULTIVO *in vitro* DE PITA (*Aechmea magdalenae*)

FIPRODEFO

FIDEICOMISO PARA LA ADMINISTRACIÓN
DEL PROGRAMA DE DESARROLLO
FORESTAL



RESPONSABLE:
DR. CARLOS ARIAS CASTRO

COLABORADORES:

DRA. MARTHA ALICIA RODRÍGUEZ MENDIOLA

M.C. PÍO ERNESTO RUIZ LARA

SR. ANDRÉS ZERMEÑO BARBA

M.C. JESÚS BERNALDO CAB MARTIN

M.C. VERÓNICA KAUL CHI

LIC. BIOL. JOSÉ ÁNGEL LÓPEZ LÓPEZ

ABRIL 2009



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE
TLAJOMULCO JALISCO



FIPRODEFO

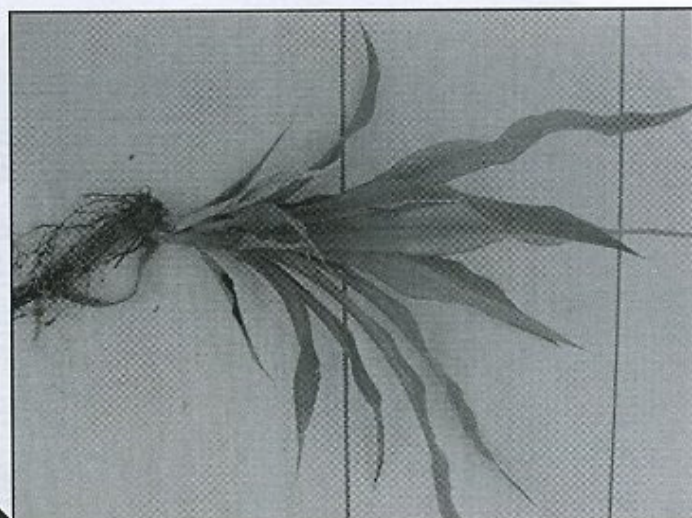
FIDEICOMISO PARA LA ADMINISTRACIÓN DEL
PROGRAMA DE DESARROLLO FORESTAL



**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE
TLAJOMULCO JALISCO**

ÍNDICE GENERAL

	Páginas
Introducción	2
Antecedentes	5
Objetivo	9
Materiales y métodos	10
Resultados	33
Conclusiones	40
Bibliografía	41



INTRODUCCIÓN

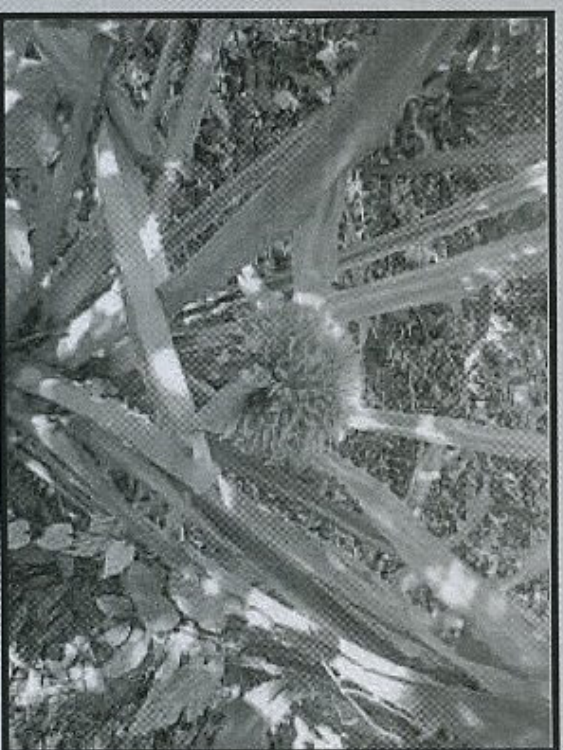


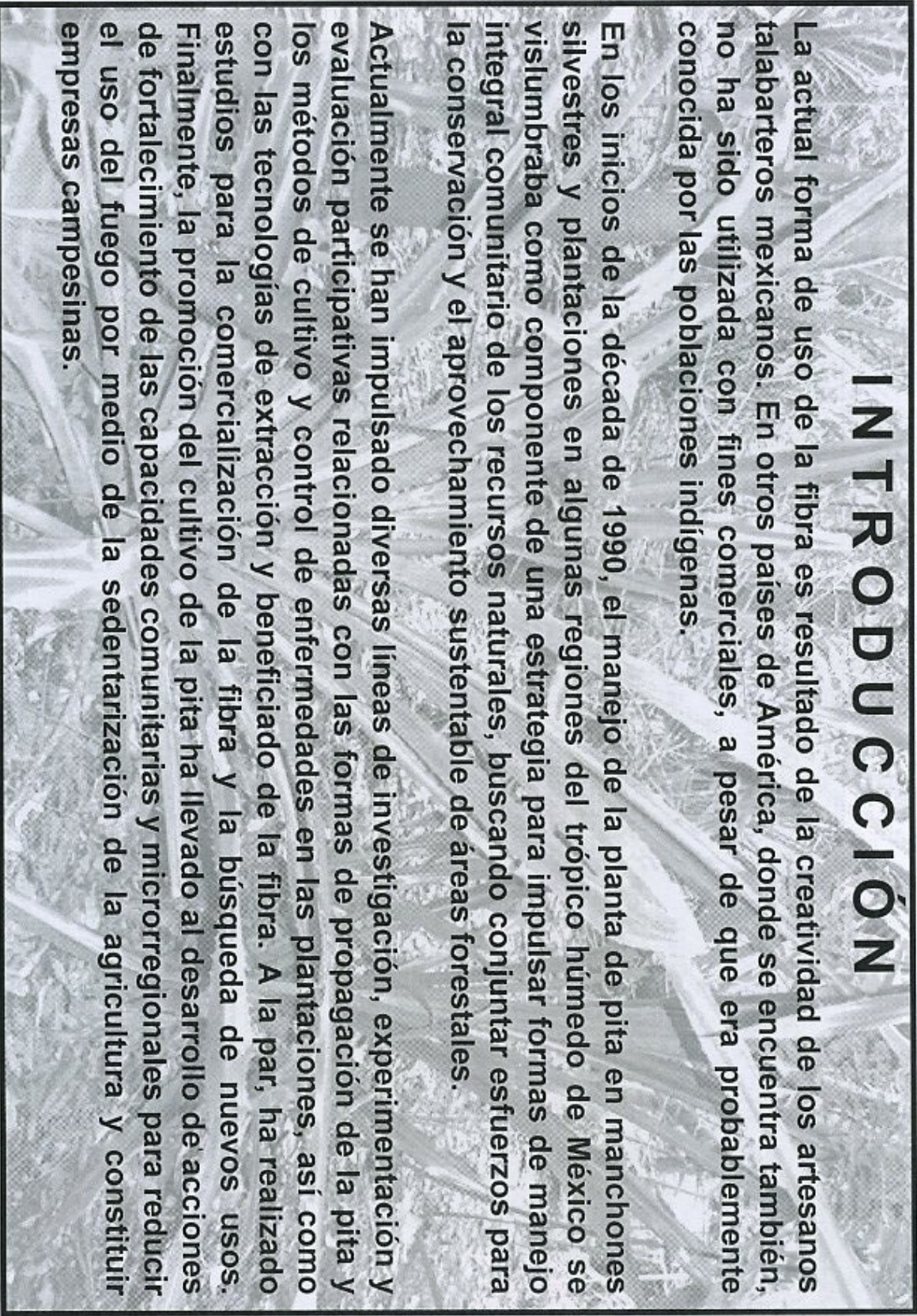
INTRODUCCIÓN

La pita (*Aechmea magdalenae*), un producto forestal no maderable (PFNM) que se extrae de una bromelia terrestre cuyo hábitat corresponde a las selvas altas perennifolias del sureste de México. Su distribución abarca también países de América Central y Venezuela, Colombia y Brasil en el norte de Sudamérica.

Por su resistencia y tamaño, la fibra de pita era empleada antiguamente por los indígenas chinantecos y mayas para confeccionar redes de pesca, mecates (cuerdas) y algunos objetos ceremoniales.

En el período colonial fue usada para elaborar aparejos en embarcaciones y hacia finales del siglo XIX empezó a ser utilizada por artesanos talabarteros del estado de Jalisco, mediante una técnica de bordado similar a la que practicaban los árabes con el hilo de plata, para adornar artículos de piel que desde entonces son distintivos de los ajuares utilizados en las artes de la charrería





INTRODUCCIÓN

La actual forma de uso de la fibra es resultado de la creatividad de los artesanos talabarteros mexicanos. En otros países de América, donde se encuentra también, no ha sido utilizada con fines comerciales, a pesar de que era probablemente conocida por las poblaciones indígenas.

En los inicios de la década de 1990, el manejo de la planta de pita en manchones silvestres y plantaciones en algunas regiones del trópico húmedo de México se vislumbraba como componente de una estrategia para impulsar formas de manejo integral comunitario de los recursos naturales, buscando conjuntar esfuerzos para la conservación y el aprovechamiento sustentable de áreas forestales.

Actualmente se han impulsado diversas líneas de investigación, experimentación y evaluación participativas relacionadas con las formas de propagación de la pita y los métodos de cultivo y control de enfermedades en las plantaciones, así como con las tecnologías de extracción y beneficiado de la fibra. A la par, ha realizado estudios para la comercialización de la fibra y la búsqueda de nuevos usos. Finalmente, la promoción del cultivo de la pita ha llevado al desarrollo de acciones de fortalecimiento de las capacidades comunitarias y microrregionales para reducir el uso del fuego por medio de la sedentarización de la agricultura y constituir empresas campesinas.

ANTECEDENTES

La fibra de pita es desde muchos puntos de vista excepcional. Sus dimensiones, brillo, finura y resistencia hacen de ella un material comparable a la seda pero de mayor vigor.

Por estas características los indígenas la usaban para manufacturar artes de pesca, amarrar puntas de flecha y elaborar calzado y objetos ceremoniales. En el agua no se encoge ni pierde resistencia. Teñida con añil permitía tejer redes de pesca invisibles, resistentes y duraderas.

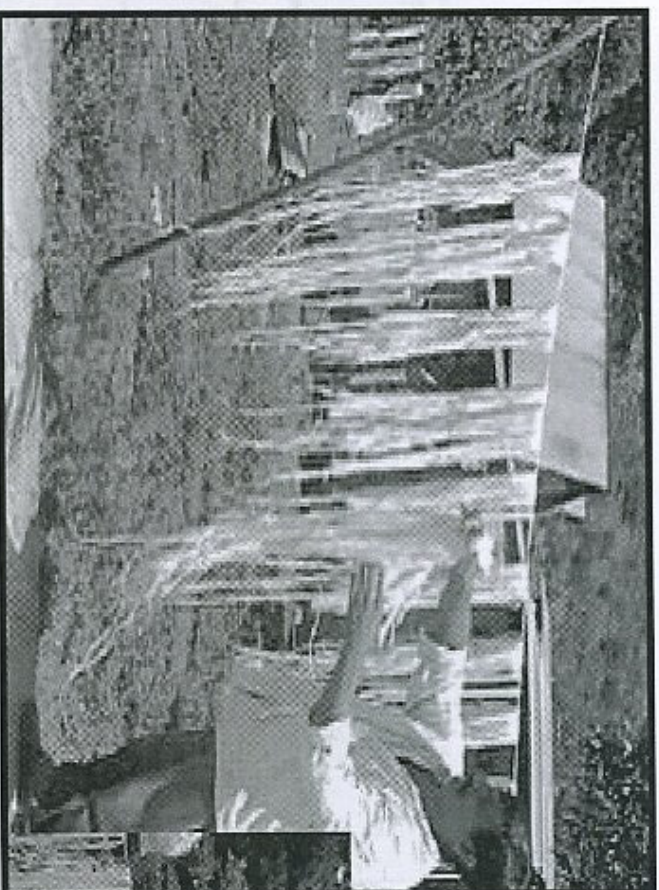
Diferentes estudios han mostrado que la fibra de pita tiene una resistencia mayor al 40%, comparadas con las fibras naturales más usadas (De la Cerda, 1967). Otra propiedad interesante consiste en la coloración blanca que presenta en estado natural (San Juan *et al*, 2000). Finalmente, entre las fibras naturales, la de pita se caracteriza también por su tamaño; según la edad de la planta de la que se extraiga puede medir de 1.7 a 2.5 m.

Actualmente, más de 2000 campesinos indígenas y mestizos ubicados en los estados de Oaxaca, Chiapas y Veracruz están extrayendo fibra de pita para abastecer la industria artesanal del piteado en el centro y norte de México.



ANTECEDENTES

Los talabarteros especializados en la fabricación de la artesanía piteada utilizan actualmente la fibra para elaborar hilos torcidos que emplean en el bordado de artículos de cuero como cinturones, botas, sillas de montar y otros más que se venden a un público que gusta del modo de vestir charro. Estos productos se comercializan en todo el país y también en los Estados Unidos, pero los mayores volúmenes de venta se registran en las tiendas del norte de México especializadas en artículos de cuero.



El precio de las artesanías de este tipo es elevado: un cinturón de buena calidad tiene un valor superior a \$100 US, una silla de montar de trabajo muy fino puede costar 10 veces más. Existe también un mercado creciente para los productos más económicos, los cuales consisten básicamente en artículos de menos de \$50 US como cintos sencillos, carteras, diademas etc.

ANTECEDENTES

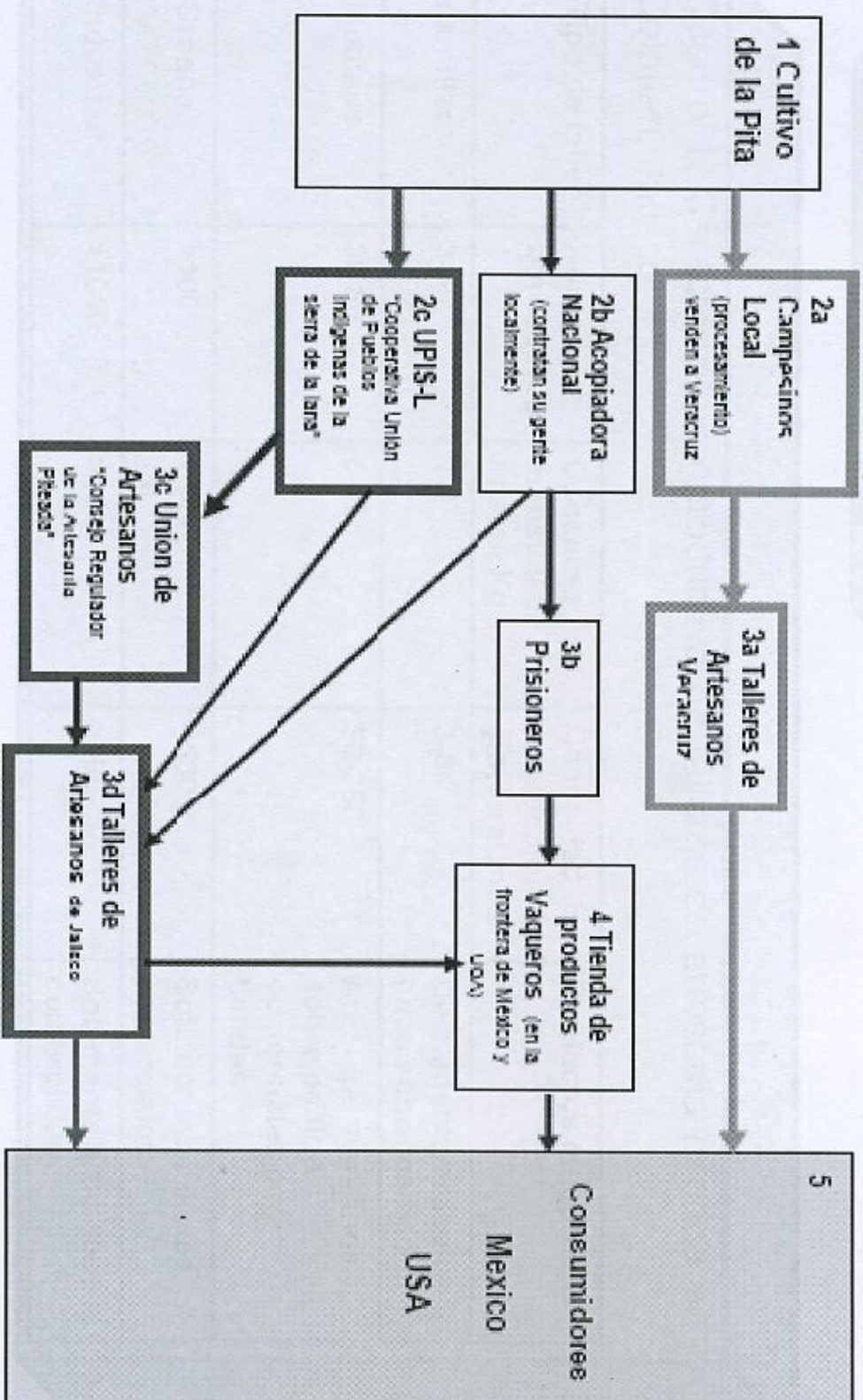


Figura 1. Red de comercialización de la pita en México

ANTECEDENTES

Cuadro 1. Caracterización productiva de talleres de artesanía piteada en Colotlán, Jalisco

Tipo de taller	Número de bordadores	Consumo mensual de pita en Kg	Capacidad de producción de cintos al mes	Productos elaborados
Familiar	3-6	1-2	3-6	Únicamente artículos finos sobre pedido
Mediano	30-80	6-15	50-250	Artículos semifinos sobre pedido y comerciales para tiendas
Grande	>100	16-50	<500	Solamente artículos comerciales
Industrial	>1000	>400	>500	Solamente artículos comerciales

OBJETIVO

Establecer el protocolo de
micropropagación de pita
(*Aechmea magdaleneae*)

MATERIALES Y MÉTODOS



Ubicación

La investigación fue realizada en el
Laboratorio de Biotecnología Vegetal del
Instituto Tecnológico de Tlajomulco,
Jalisco (ITTJ)

Material vegetal

El material vegetal fue suministrado por
dicho laboratorio.

- Para un crecimiento vigoroso y saludable, las plantas necesitan tomar del suelo relativamente grandes cantidades de iones inorgánicos (**macronutrientes**)-sales de nitrógeno, potasio, calcio, fósforo, magnesio y azufre.
- **Nitrógeno** se adiciona en grandes cantidades, se encuentra presente en forma de nitrato (KNO_3) o iones de amonio (NH_4NO_3).
- **Sulfato de magnesio**, ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) satisface tanto el requerimiento de magnesio como el de azufre.
- **Fósforo**, puede ser representados por (KH_2PO_4).
- **Potasio**, se encuentra en grandes cantidades, es un catión que se da en forma de KCl , KNO_3 , KH_2PO_4 .
- **Calcio**, la adición de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en forma anhidra de cualquier sal reúne las características para el calcio.
- **Sodio**, este catión no es requerido por plantas superiores sin embargo, es esencial para cultivo de halófitas y plantas C_4 .
- **Cloruro**, este ión esta presente en forma de KCl ó CaCl_2

MATERIAL Y MÉTODOS

Medio de Cultivo (Macronutrientes)

- Las células vegetales requieren ciertos **micronutrientes**, los mas esenciales son: Fe, Mn, Zn, Bo, Cu, Co y Mo. Los últimos cinco elementos son esenciales para la síntesis de clorofila y la función de los cloroplastos.
- **Fe** es requerido para la formación de precursores de clorofila
- **Mn** es necesario para el mantenimiento de la estructura y proceso fotosintético.
- **Cu** y **Zn** son requeridos para la oxidación e hidroxilación de compuestos fenólicos.
- **Mo** y **Fe** forman parte de las enzimas nitrato reductasa y nitrógenasa.
- **Co** metal componente de la vitamina B₁₂.
- **Bo** es necesario para el mantenimiento de la actividad meristemática.
- Varios micronutrientes están relacionados con la síntesis de precursores de hormonas como es el Zn con el ácido indol acético

MATERIAL Y MÉTODOS

Medio de Cultivo (Micronutrientes)

- Las vitaminas son necesarias para llevar una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo y son requeridas en pequeñas cantidades.
- Tiamina (vitamina B₁) es esencial para el crecimiento de las células, se añade en cantidades de 0.1 a 30 mg/l
- Piridoxina, (Vitamina B₆), se añade como piridoxina HCl.
- Ac. Nicotínico (niacina).
- Mio-inositol, no es una vitamina propiamente, sino un azúcar-alcohol. Tiene un efecto estimulante sobre la morfogénesis, probablemente participa en la vía biosintética del ácido galacturónico, ayudando a la formación de varios constituyentes celulares, como pectina y además compuestos que intervienen en la división celular.
- Riboflavina es inhibidor del crecimiento de raíces.

MATERIAL Y MÉTODOS

Medio de Cultivo (Vitaminas)

Para reducir pasos en la preparación de un medio de cultivo y para aumentar la precisión pesando cantidades específicas de sustancias muy pequeñas, se preparan soluciones concentradas de muchos de los ingredientes (sales inorgánicas, orgánicas, reguladores de crecimiento).

- **Solución Inorgánica.** Algunas sustancias son incompatibles con otras a ciertas concentraciones y se precipitan, por lo que éstas deben ser preparadas individualmente. Ejemplo: calcio no puede mezclarse con fosfato ó sulfato, el magnesio con el fosfato. Para soluciones de sales, la concentración final puede ser de 10 veces como se observa en la **Fig.2 y 4.**

- **Solución orgánicos.** Las soluciones concentradas de algunas sustancias orgánicas son solubles en agua. La concentración final puede ser 100 veces como se observa en la **Fig.3 y 4.**

- **Carbohidratos.** Son utilizados como fuente de energía y de carbono, sacarosa es el azúcar empleado universalmente, la concentración a la cual se utiliza la sacarosa es de 30 g l⁻¹. como se observa en la **Fig. 4.**

MATERIAL Y MÉTODOS

Preparación del Medio de Cultivo



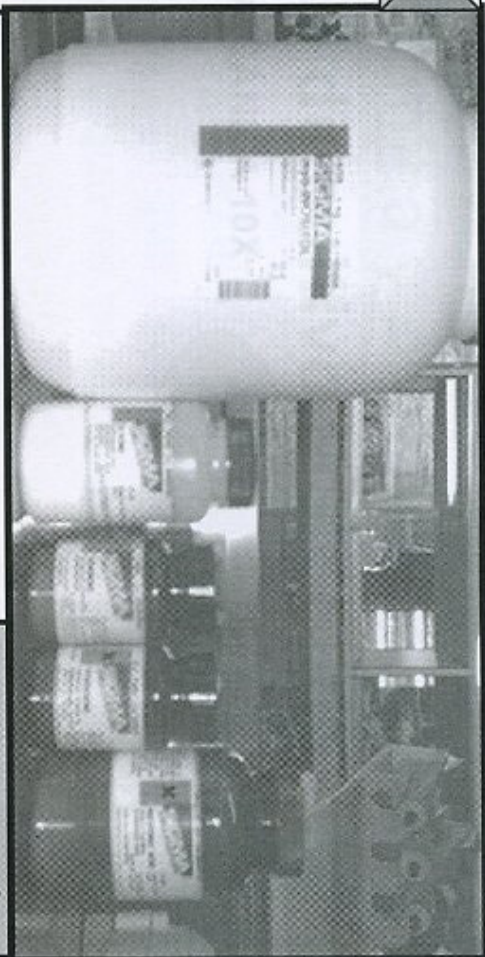
FIGURA 2

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN
1. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.440 g/l
2. KNO_3	1.900 g/l
3. NH_4NO_3	1.650 g/l
4. KH_2PO_4	0.170 g/l
5. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.860 mg/l
6. $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37.250 mg/l
7. $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	16.880 mg/l
8. KI	0.830 mg/l
9. $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.600 mg/l
10. H_3BO_3	6.200 mg/l
11. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.370 g/l
12. $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025 mg/l
13. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025 mg/l
14. $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.250 mg/l

MATERIAL Y MÉTODOS

Medio Murashige & Skoog (MS) Solución Inorgánica

FIGURA 3



REACTIVOS	CONCENTRACIÓN
1.- GLICINA	2.0 mg/l
2. MIOINSITOL	100.0 mg/l
3. TIAMINA-HCL	0.1 mg/l
4. PIRIDOXINA-HCL	0.5 mg/l
5. AC. NICOTINICO	0.5 mg/l

MATERIAL Y MÉTODOS

**Medio Murashige & Skoog (MS)
Solución Orgánica**

Incorporación de la solución inorgánica y orgánica

FIGURA 4

Medio de cultivo MS Sólido

SOLUCIÓN INORGÁNICA 10X

100 ml



SOLUCIÓN ORGÁNICA 100X

10 ml



AZÚCAR

30 g



Agua destilada. La destilación en recipientes de vidrio ha sido el método tradicional para la purificación del agua. Los mejores resultados es cuando se considera los siguientes aspectos: a) el condensador debe estar bien caliente para que los compuestos volátiles sean expulsados en el vapor, además el agua fría que se utilice debe estar a 10°C, b) desechar el agua que se produzca en los primeros 10-15 min de iniciada la operación, c) el recipiente donde esté hirviendo el agua, debe ser lavado y secado después de algunas horas para quitar las impurezas acumuladas como se observa en la **Fig.5.**

Ajuste del pH. Para ajustar el pH se emplearon soluciones 1.0N de NaOH y 1.0 N de HCl. El pH se ajustó antes de que el medio sea diluido a su volumen final y antes de agregar el agar como se observa en la **Fig.5.**

Agente solidificante. Se ha empleado el "gelrite" como un sistema de soporte en la preparación de medios sólidos. El agar se disolvió en horno de microondas por 8 min. sin olvidar la constante agitación como se observa en la **Fig.5.**

MATERIAL Y MÉTODOS

Incorporación del agente solidificante y ajuste de pH al Medio de Cultivo MS Sólido

FIGURA 5

**AFORAR CON AGUA
DESTILADA**

1000 ml



pH

5.7



**2.0 g/l GELRITE
DISOLVER USANDO
MICROONDAS**

5.7



MATERIAL Y MÉTODOS

**Incorporación del agente solidificante
y ajuste de pH al Medio de Cultivo MS**

Como se observa en la **Fig. 6**, los frascos con una capacidad de 100 ml se les adicionó 20 ml de medio de cultivo, los cuales fueron cubiertos con tapas de plástico especiales que soportan la esterilización.

Esterilización del medio de cultivo.

Los frascos de 100 ml con 20 ml de medio de cultivo fueron colocado en las autoclaves de 40 litros de capacidad. La esterilización del medio se llevó a cabo a 121°C y 15 Lbs. de presión durante 15 a 20 min. Como se observa en la **Fig. 6**.

Algunos problemas que se presentaron en la preparación de medios de cultivo fueron la inactivación de algunos compuestos en el medio tales como: Carbohidratos. La desestabilización de los carbohidratos por un sobrecalentamiento (caramelización). Por otro lado, cuando se tienen combinación de amino ácidos forman una reacción llamada de "Maillards" en el que el medio de cultivo cambia de transparente-claro a transparente-amarillo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Esterilización del medio de cultivo

FIGURA 6

VACIAR

20 ml



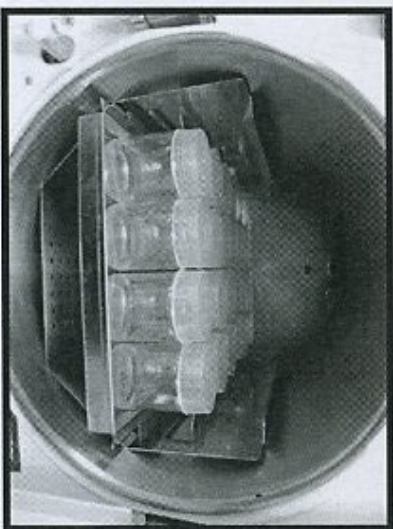
TAPAR

Frascos



ESTERILIZAR

**15 lbs
15 min**



MATERIAL Y MÉTODOS

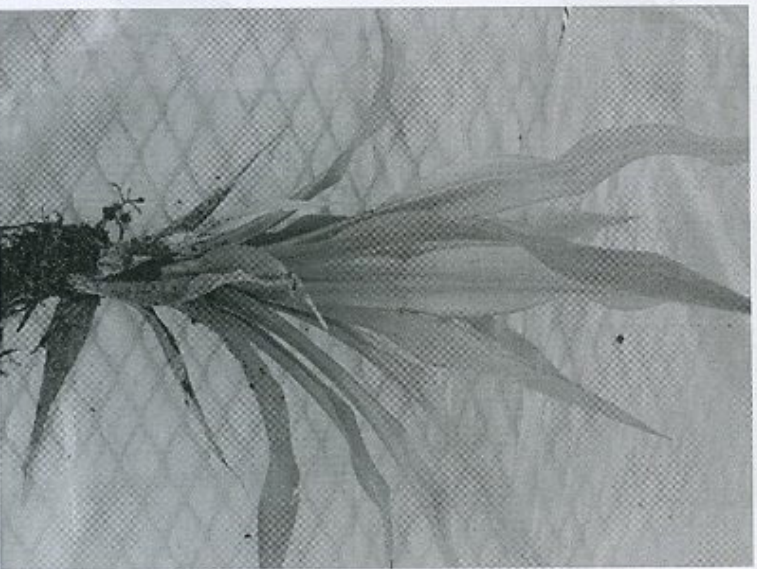
Esterilización del medio de cultivo

Diseción y Extracción del Meristemo. La extracción del meristemo se hace con la ayuda de un microscopio estereoscópico, (Fig.7). Las pinzas y bisturí se flamean en alcohol al 80%, antes de que se utilicen en la extracción. Para la **diseción** el tallo se sujeta de la base con ayuda de las pinzas de diseción manipulado con el bisturí por lo que se eliminan las hojas expandidas hasta dejar al descubierto el domo meristemático. El meristemo puede llevar uno o dos primordios foliares; si lleva más primordios, se deben eliminar, (Fig.7).

Después que se ha despejado el meristemo, se hace con el bisturí un corte en la base del meristemo, de manera que de un solo corte quede liberado el meristemo, para evitar, al máximo, el daño en las células de la base.

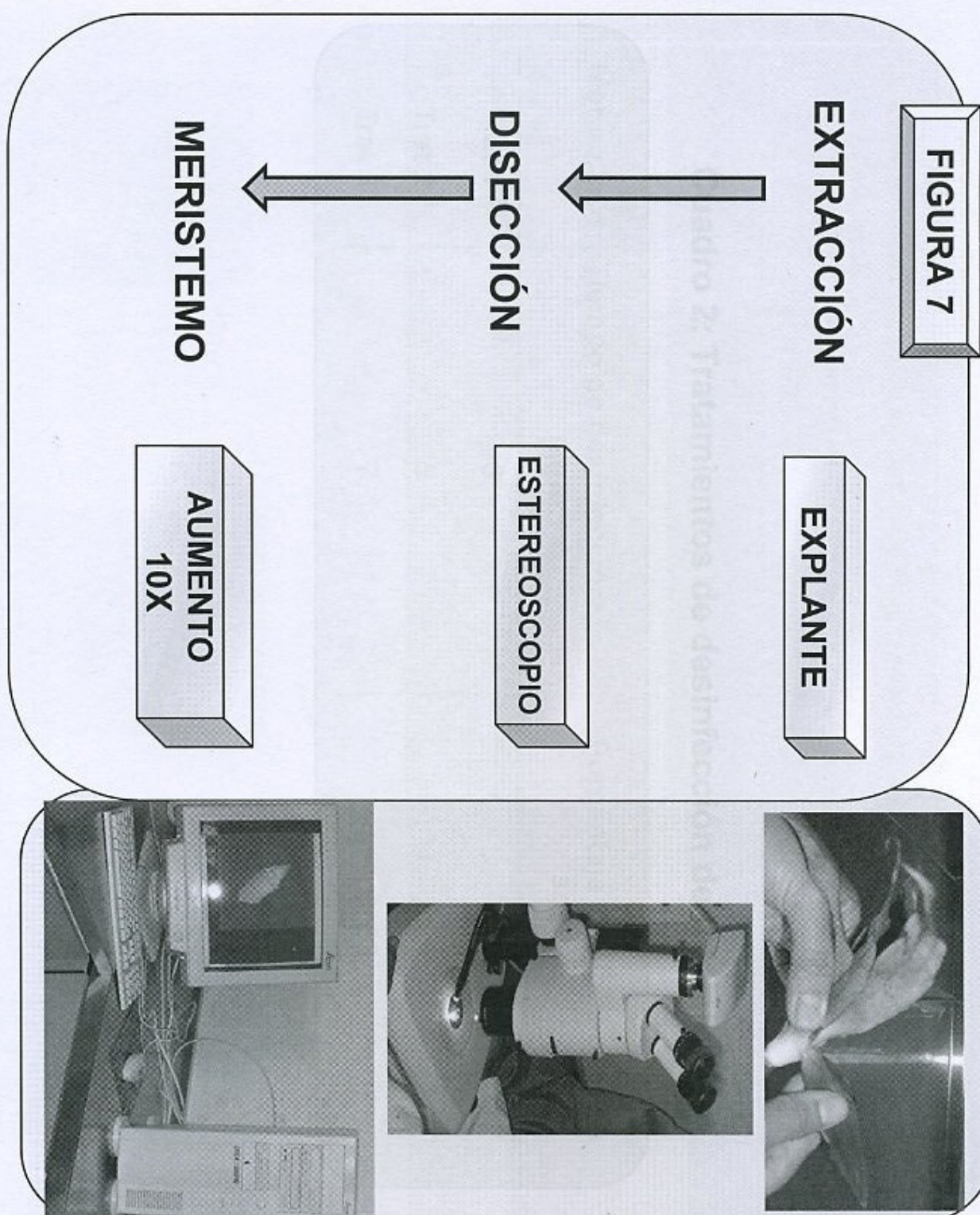
El **domo meristemático** se coloca en la punta de la pinza y se introduce en el frasco de vidrio para ser desinfectado como se observa en la Fig. 7.

El cultivo de meristemas ha sido tradicionalmente utilizada en la iniciación de los cultivos *in vitro* y a la vez se ha señalado su uso en la obtención de plantas sanas, o sea libres de patógenos (Morel y Martin, 1955).



MATERIAL Y MÉTODOS

Diseción y Extracción del Meristemo



MATERIAL Y MÉTODOS

Disección y Extracción del Meristemo

Dentro de la campana de flujo laminar se prepara una solución de hipoclorito de sodio al 1 %, después se lavan con una pipeta de vidrio 6 ml de hipoclorito de sodio a 60 ml de agua estéril contenido en frascos de vidrio de 100 ml. Después se introducen los domos meristemáticos y se agitan en forma constante durante 3, 5 y 7 min, como se observa en la fig. 8.

FIGURA 8

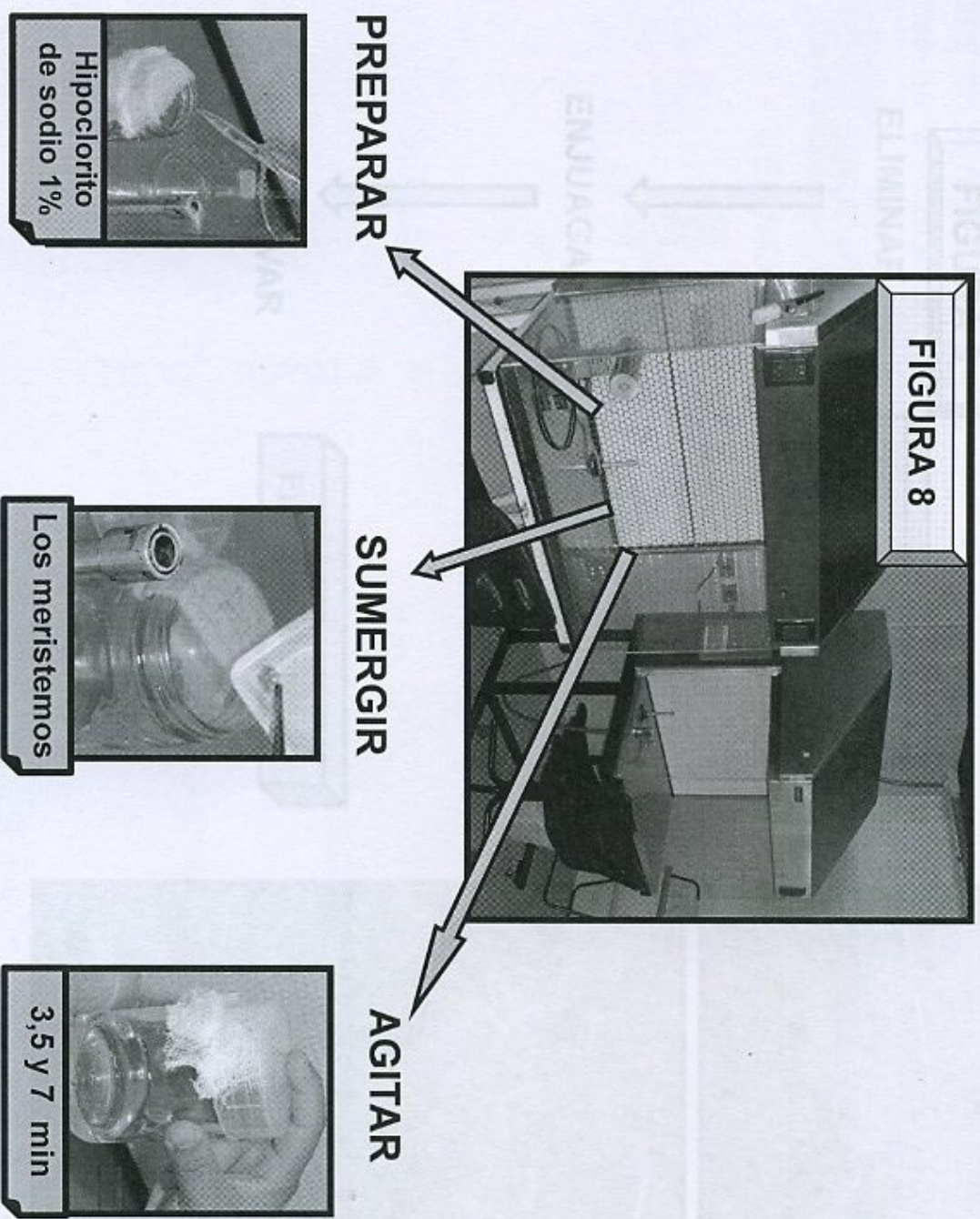
Cuadro 2: Tratamientos de desinfección de meristemas

Meristemas	Tiempo de desinfección (min)	Porcentaje de hipoclorito de sodio (%)
Trat 1	3	60
Trat 2	5	60
Trat 3	7	60

MATERIAL Y MÉTODOS

Desinfección de Meristemas

Dentro de la campana de flujo laminar, se prepara una solución de hipoclorito de sodio al 1 %, después se vierten con una pipeta de vidrio 6 ml de hipoclorito de sodio a 60 ml de agua estéril contenida en frascos de vidrio de 100 ml. Después se introducen los domos meristemáticos y se agitan en forma constante durante 3, 5 y 7 min, como se observa en la **fig.8**.

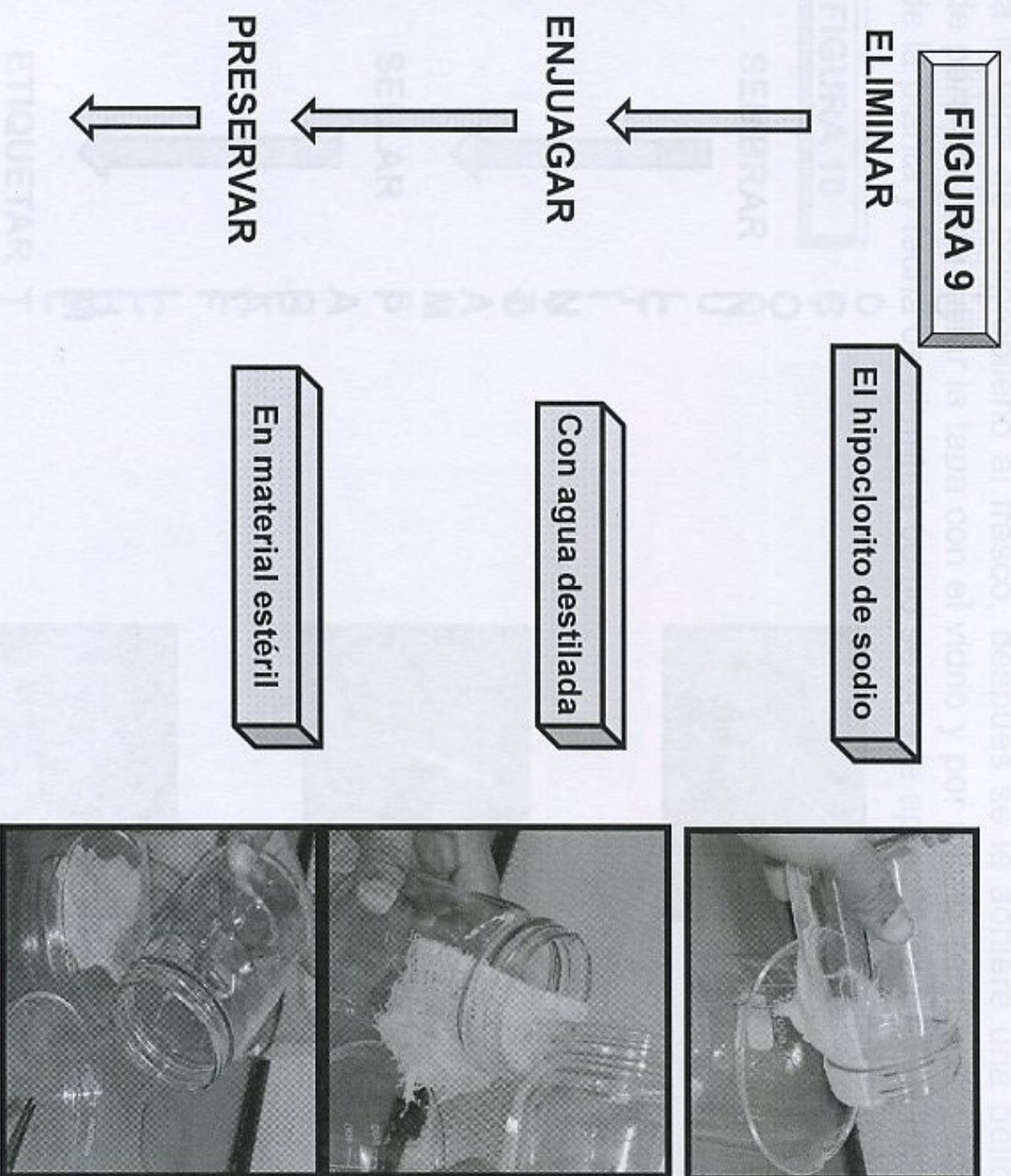


MATERIAL Y MÉTODOS

Desinfección de Meristemas

Se enjuagan tres veces con agua destilada estéril, tratando de eliminar todos los residuos del hipoclorito usado previamente. Los meristemos después son colocados en una caja de petri estéril como se observa en la.

Fig.9.



MATERIAL Y MÉTODOS

Enjuague de Meristemos

El meristemo se coloca en la punta de las pinzas y se introduce en el frasco que contiene el medio de cultivo. La base del meristemo tiene que quedar "sentada" sobre la superficie del medio de cultivo del frasco.

Se coloca la tapa de polipropileno al frasco, después se le adhiere una película plástica de parafilm para sellar la tapa con el vidrio y por último se etiqueta con el nombre de la planta y fecha de siembra como se puede apreciar en la **Fig.10**.

FIGURA 10

SEMBRAR



SELLAR



ETIQUETAR



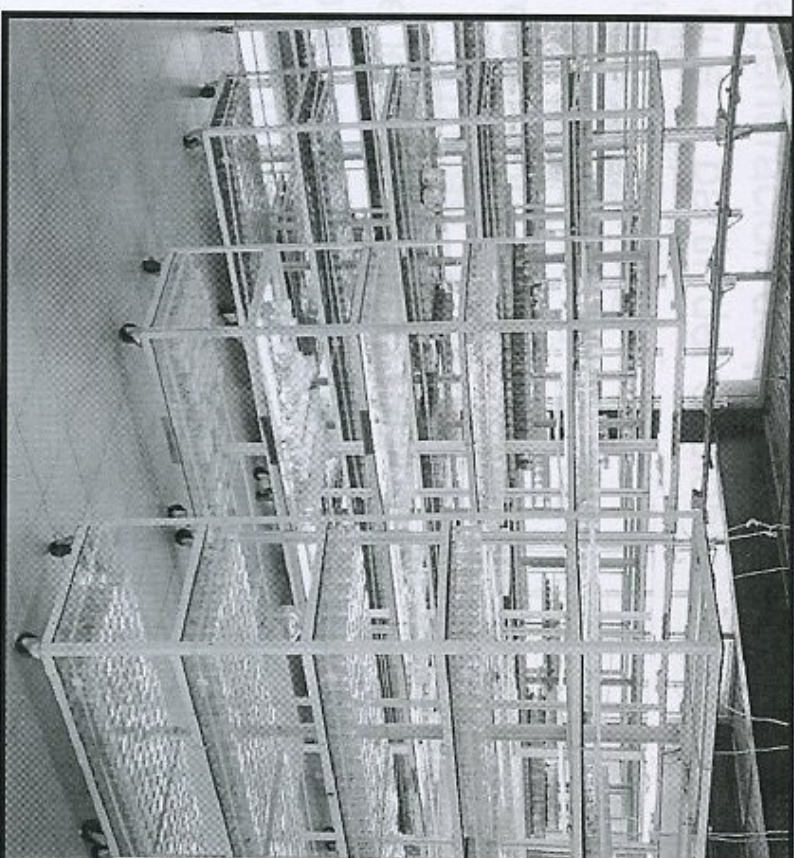
MATERIAL Y MÉTODOS

Siembra del meristemo en el medio de cultivo

Los frascos inoculados con meristemas fueron ubicados en el cuarto de crecimiento (**Fig. 11**) con las condiciones ambientales siguientes:

FIGURA 11

Intensidad luminosa	1000 a 2000 lux
Temperatura	25 °C
Fotoperíodo	16/8 horas de iluminación
Humedad relativa	80 a 90 %



LOS MERISTEMOS SE COLOCARON EN EL CUARTO DE CRECIMIENTO BAJO CONDICIONES CONTROLADAS DE 25 °C. CON UNA ILUMINACIÓN DE 1000-2000 LUX. DURANTE 2 MESES.

- Sin duda, una de las mayores ventajas que ofrece cultivo de tejidos es la posibilidad de regenerar plantas completas a partir de pequeños fragmentos de tejido vegetal incubados en un medio artificial apropiado. Esto tiene aplicaciones inmediatas en campos como la propagación masiva de plantas de alto valor.
- Una de las vías para la regeneración de plantas *in vitro* es la organogénesis, en el que a partir del explante original se originan brotes adventicios.
- Entre los factores que contribuyen a la inducción de brotes destacan los reguladores de crecimiento en particular las citocininas y auxinas. En el presente estudio al medio de cultivo MS se le adicionaron BAP y KIN (0.5 y 1 mg l⁻¹) respectivamente para inducir la formación de brotes adventicios, como se puede observar en la **Fig.12** y cuadro 3.

MATERIAL Y MÉTODOS

Medio de cultivo para inducción de brotes de pita

FIGURA 12

MEDIO DE CULTIVO MS

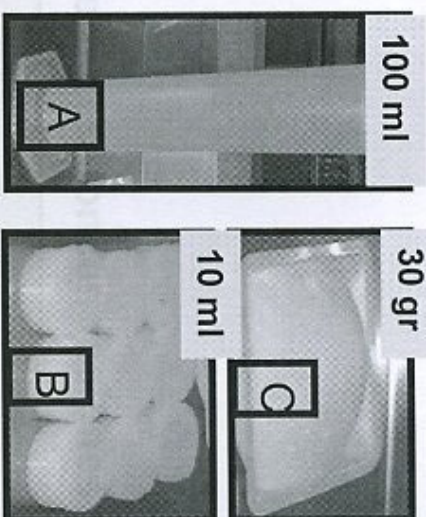
Sol. Inorgánica ^A
Sol. Orgánica ^B
Azúcar ^C

HORMONAS

BAP y KIN
(0.5 y 1 mg l⁻¹)

ESTERILIZAR

15 Lbs. 15
min.



MATERIAL Y MÉTODOS

Medio de cultivo para inducción de brotes de pita

Cuadro 3. Tratamientos con hormonas y diferentes concentraciones

Hormona	Concentración (mg l ⁻¹)
Control	0
BAP	0.5
BAP	1
KIN	0.5
KIN	1

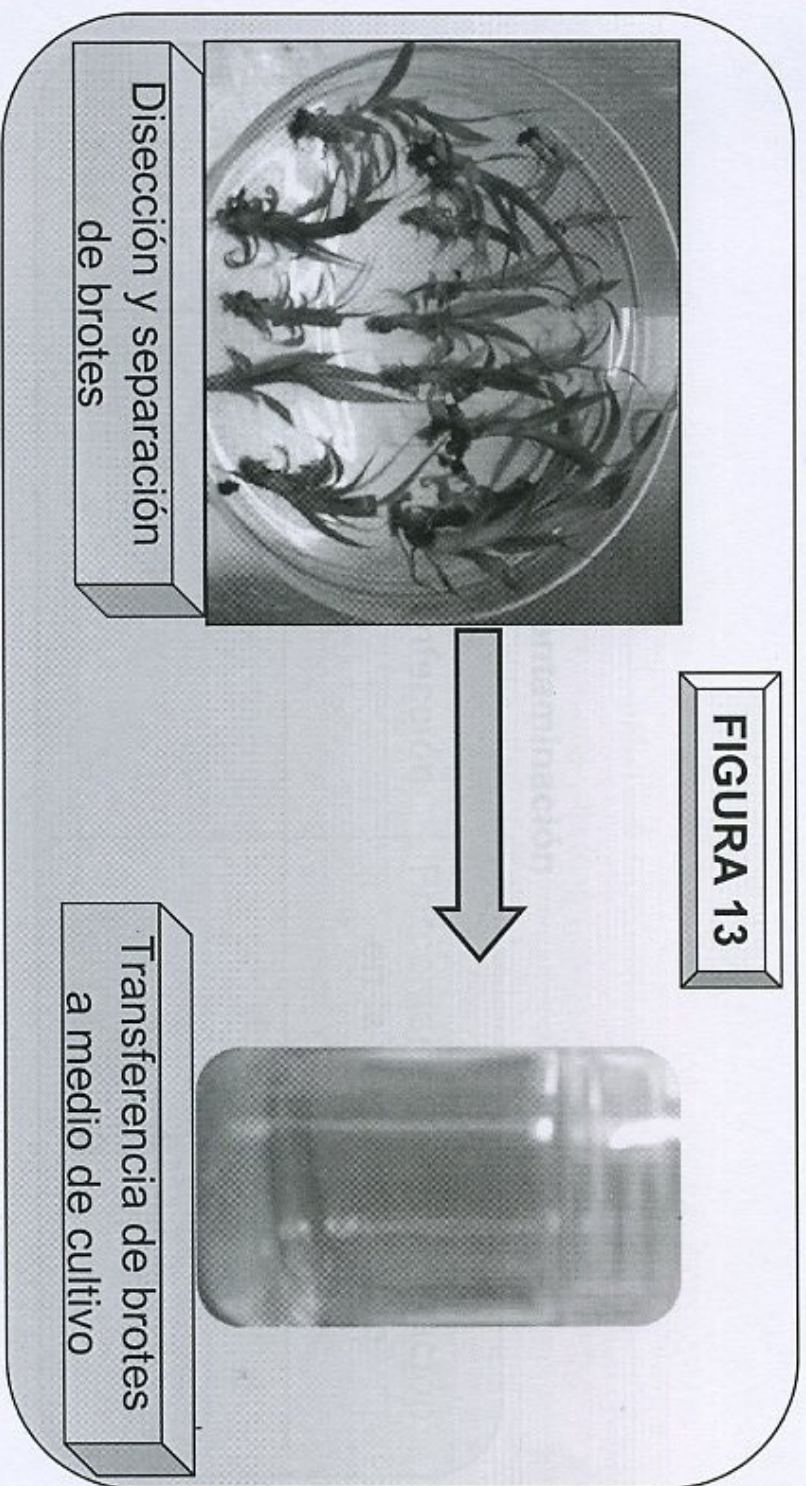
MATERIAL Y MÉTODOS

Medio de cultivo con hormonas para inducción de brotes de pita

RESULTADOS



La formación de los brotes ocurrió desde los 14 días después de la siembra del meristemo. Para el establecimiento de los brotes, se cuidó de que al separarlos de la plántula fueran colocados en forma vertical, y que se sujetaran bien al nuevo medio de cultivo, como se observa en la Fig. 13.



RESULTADOS

Disección y transferencia de los brotes de pita

En el cuadro 4, se presenta el porcentaje de contaminación que se observó en los diferentes tratamientos para la desinfección de meristemas, el tiempo utilizado de 3 min produjo el 90 % de contaminación, el tiempo óptimo determinado para la desinfección de meristemas de pita fue de 5 min ya que este tiempo se observó 0 % de contaminación y observó crecimiento de meristemas.

Cuadro 4. Porcentaje de contaminación

Meristemas	Tiempo de desinfección (min)	Porcentaje de contaminación en la siembra <i>in vitro</i> (%)
Trat 1	3	90
Trat 2	5	0
Trat 3	7	0

RESULTADOS

Tratamientos de desinfección

En el cuadro 5, se presenta los promedios de brotes observados en dos tipos de hormonas y las dos concentraciones utilizadas de las mismas, el mayor número de brotes se logró con BAP y una concentración de 1 mg l⁻¹, la cual produjo un promedio de 16 brotes, mientras que en las plantas control sin hormonas no se observó generación de brotes.

Cuadro 5. Promedio de brotes obtenidos con dos concentraciones de dos diferentes hormonas

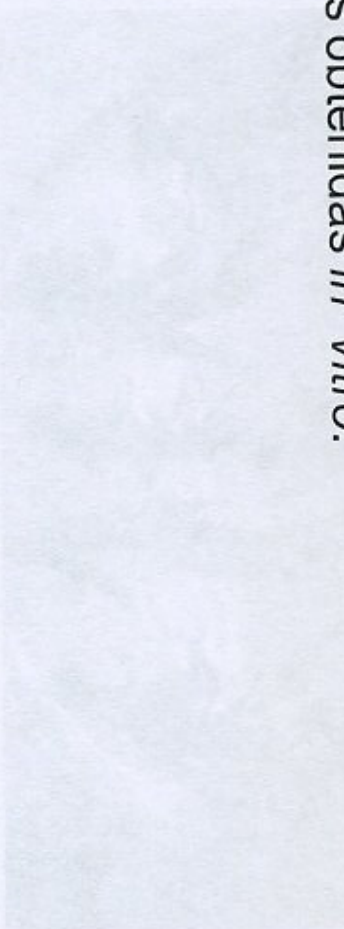
Hormonas	Concentración (mg l ⁻¹)	Promedio de brotes
Control	0	0
	0.5	9
	1	16
BAP	0.5	6
	1	8
KIN		

RESULTADOS

Tratamientos con hormonas

- Después de 15 días de incubación los brotes transferidos en los medios de cultivo, el crecimiento de estas plantas *in vitro*, alcanzaron alturas hasta 7 cm, y el número de brotes adecuados, las cuales fueron separadas cuidadosamente como se observa en la figura 14.

- Después de la multiplicación *in vitro* de las plantas de pita, se procedió a la aclimatación de estas en invernadero con las condiciones medio ambientales (temperatura, humedad y luz) requeridas para este proceso, como se aprecia en la figura 15. Se alcanzó el 80 % de plantas aclimatadas obtenidas *in vitro*.



Brotes de *A. magdalenae*

RESULTADOS

Proliferación de los brotes de pita

RESULTADOS

Aclimatación de pitas



Figura 15

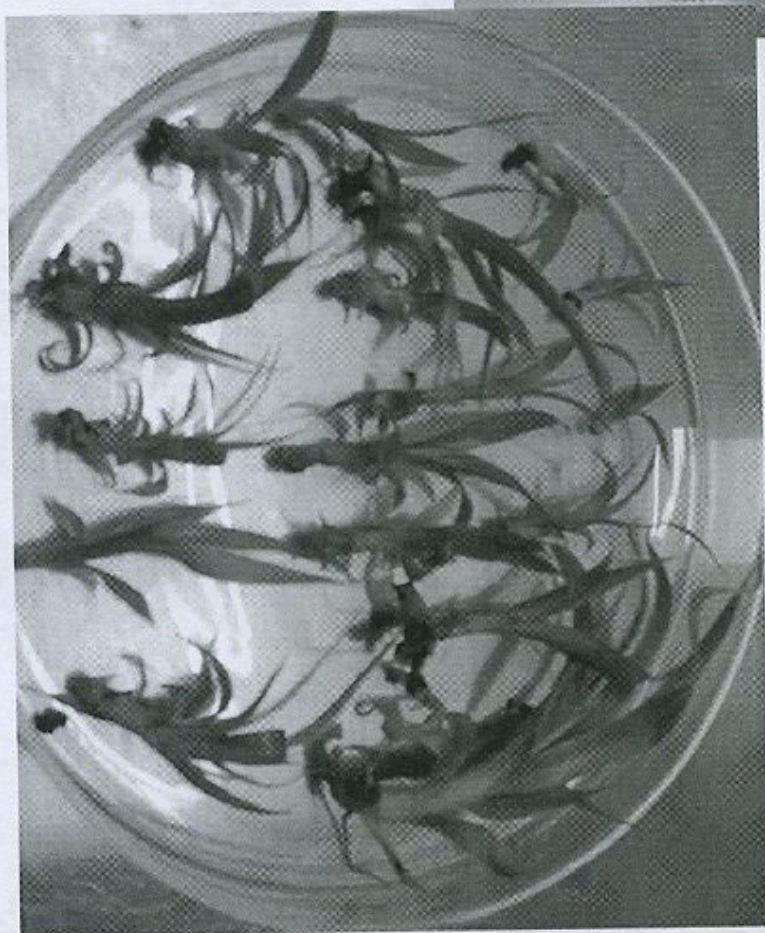


Figura 14

Brotes de *A. magdalenae*

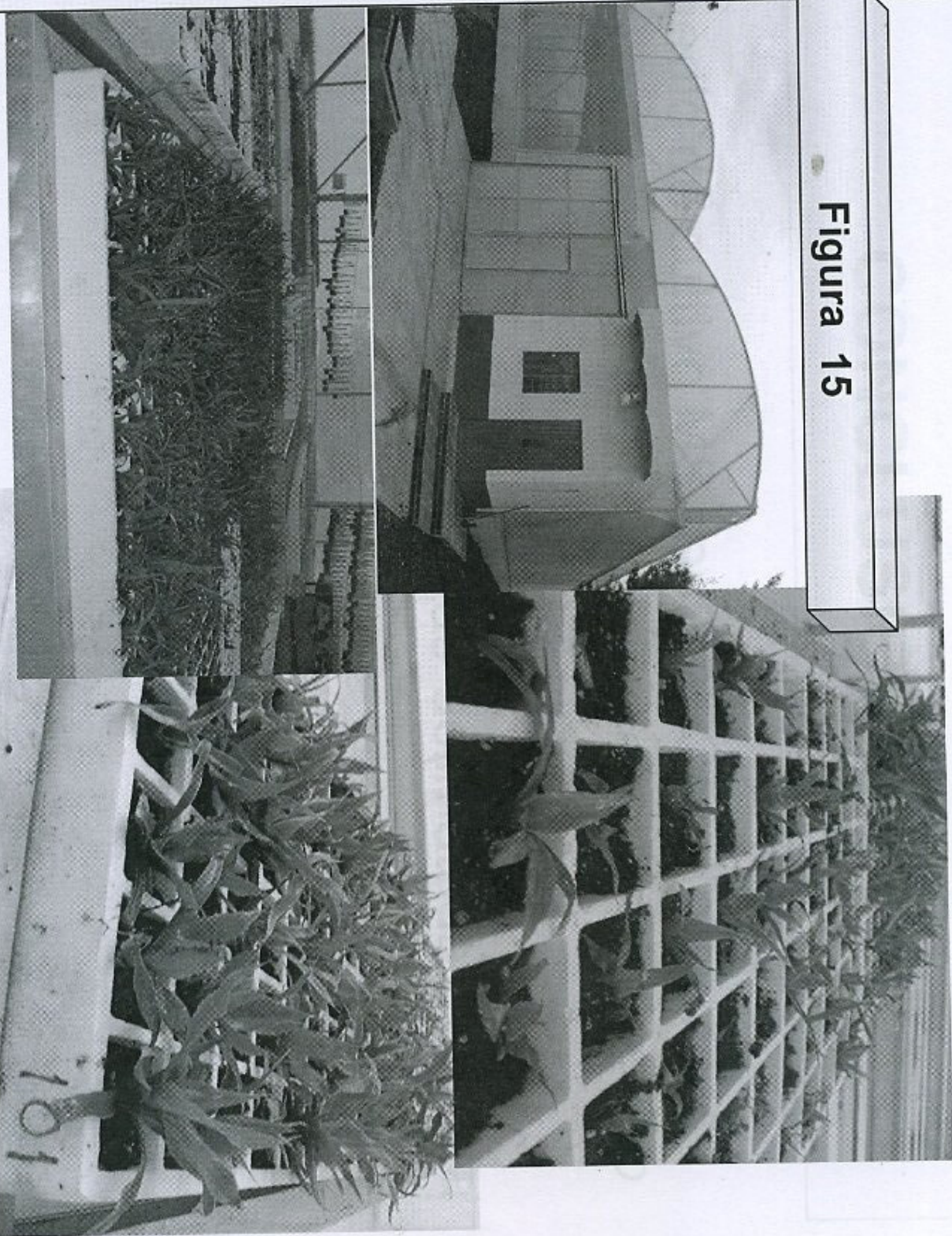
RESULTADOS

Separación de brotes de pita

RESULTADOS

Aclimatación de plantas de pita

Figura 15



CONCLUSIONES

El medio de cultivo MS con BAP resultó el mas adecuado para la multiplicación de plantas *in vitro* de pita

Se logró el 80 % de plantas aclimatadas de pita en invernadero

- Morel G y Martin C (1955) Guérison de pomme de terre de maladie a virus. C.R. Acad. Sci. Paris. 1315-1324
- Orellana, M. 1997. Desarrollo de un sistema de cultivo *In vitro* para los explantes nodales de Caoba (*Swietenia macrophylla*. King). Tesis Mag.Sc. Turrialba, Costa Rica. CATIE. 85 p.
- Programa de Recursos Biológico Colectivo/CONABIO, 2002, "Memoria del seminario taller para la creación de una asociación de productores de pita y una marca colectiva para la fibra". Arroyo Blanco y San Juan Lalana, Oaxaca, Methodus Consultora SC y CONABIO, manuscrito inédito.
- Sanjuán, R., J. M. González y M. Huerta, 2000, *Fuente y arte del piteado*: Oaxaca, Jalisco. Guadalajara, Jalisco, Secretaría de Promoción Económica del Gobierno del Estado de Jalisco.
- Villalobos, A., Leung, D.W. y Thorpe, T.A. 1984. Light-cytokinin interaction in shoot formation in cultured cotyledon explants of radiata pine. *Physiol. Plant*.

BIBLIOGRAFIA