

Inmuno Impresión Directa de Tejidos para el diagnóstico masivo de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* en caña de azúcar (*Saccharum* spp.) en Cuba

Tissue-Blot Enzyme Immunoassay for the massive diagnosis of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in sugarcane (*Saccharum* spp.) in Cuba

Javier Delgado Padrón, Juana de las M. Pérez Pérez, Osmany de la C. Aday Díaz, Mario Casas González, Tania Casero Rodríguez, Yaquelin Puchades Izaguirre y María de la Luz La O Hechavarría.

Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA). Carretera a CUJAE Km 1½, Boyeros, C.P. 19390, La Habana, Cuba, lazaro.pardo@inicamy.azcuba.cu, lao@inica.azcuba.cu

RESUMEN

Los síntomas, tanto externos como internos de la enfermedad raquitismo de los retoños causada por la bacteria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Davis) Evtushenko et al. en la caña de azúcar, son inespecíficos, por lo que no son suficientes para su identificación. El objetivo de este trabajo fue utilizar la técnica Inmuno Impresión Directa de Tejidos para el diagnóstico masivo de la bacteria causante del raquitismo de los retoños en la caña de azúcar en Cuba. Se utilizaron los cultivares CP31-294 (infectado) y My5514 (sana). Se probaron diferentes diluciones del anticuerpo específico anti-*L. xyli* subsp. *xyli* (cabra) y el anticabra conjugado con fosfatasa alcalina. En la confirmación de la técnica serológica mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se utilizaron 140 cilindros de tallos de caña de azúcar (70 positivos y 70 negativos). Quedó establecida la técnica de diagnóstico serológico con el anticuerpo específico (cabra) diluido 1/3000 y el conjugado anticabra fosfatasa alcalina 1/800. Se encontró alta correspondencia entre los resultados del diagnóstico de las muestras por Inmuno Impresión Directa de Tejidos y la PCR. Los resultados de este estudio demuestran la posibilidad de utilizar la Inmuno Impresión Directa de Tejidos para la detección de la bacteria *L. xyli* en la caña de azúcar, mediante un procedimiento simple que permite analizar gran número de muestras en poco tiempo, con menor costo y alta confiabilidad.

Palabras clave: *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, raquitismo de los retoños, caña de azúcar, diagnóstico, Inmuno Impresión Directa de Tejidos.

ABSTRACT

External and internal symptoms caused by the bacterium *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in sugarcane are unspecific, therefore not suitable for its identification. The aim of this work was to standardize and validate the tissue blot immuno-assay technique (TBIA) for the massive diagnosis of the bacterium in this crop. To this purpose cultivars CP31-294 (infected) and My5514 (bacterium free) were selected. Different dilutions were of the specific anti *L. xyli* subsp. *xyli* (goat) and the anti goat alkaline phosphatase were proven. One hundred forty cylinders of sugarcane stems were used (70 positive and 70 negative) to validate the TBIA technique by with to Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. The standardization of TBIA for diagnostic was achieved with the specific antibody diluted 1/3000 and the conjugate diluted 1/800. The validation indicators showed the high correspondence between diagnosed samples from TBIA and PCR. This result showed that TBIA technique may be used as a method for the detection of this bacterium in sugarcane, allowing to analyze a great number of samples in a short time with less cost and high reliability.

Key words: *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, ratoon stunting disease, sugarcane, diagnosis, Tissue-Blot Enzyme Immunoassay.

INTRODUCCIÓN

Entre las enfermedades de mayor importancia que constituyen un factor limitante para la obtención de altos rendimientos agrícolas en el cultivo de la caña de azúcar en Cuba, se encuentran carbón (*Sporisorium scitamineum* (Piepenbr) Sydow), roya parda (*Puccinia melanocephala* Sydow y P. Sydow), escaldadura foliar (*Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson), virus de

la hoja amarilla (*SCYLV* (Lockhart) Dárcy) y raquitismo de los retoños (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Davis) Evtushenko et al.) (Pérez et al., 2013).

El agente causal del raquitismo de los retoños es una bacteria que se disemina en la planta a través del xilema e impide su normal funcionamiento, lo que

interfiere el transporte de agua y nutrientes. Generalmente, produce fluido fibrovascular que originan lesiones en forma de puntos, comas y líneas cortas de color anaranjado-rojizo en la base de los nudos de tallos, retraso del crecimiento, disminución del número de tallos por cepa y plantas con apariencia raquílica (Alvez *et al.*, 2016).

Las pérdidas del rendimiento agrícola se encuentran entre el 10 y 60 %, en dependencia de la resistencia del cultivar a la bacteria, la cantidad de retoños cosechados sin reponer la cepa, las atenciones agronómicas efectuadas al cultivo, los estados de estrés, así como la utilización de material de propagación infectado y los instrumentos de corte que facilitan su diseminación en las plantaciones cañeras (Garcés *et al.*, 2013).

Los síntomas, tanto externos como internos de la enfermedad raquitismo de los retoños, son inespecíficos, pues pueden estar enmascarados y originarse por varias causas (Silva, 2013). Debido a que estos no son suficientes para su identificación, es necesario el empleo de métodos de diagnósticos seguros y precisos. En estos es vital realizar un adecuado reconocimiento de su agente causal para elaborar un programa de manejo de la misma. Este hecho pone de manifiesto la importancia de realizar análisis en el laboratorio apropiados con el fin de determinar tempranamente el estado sanitario de las plantaciones cañeras (García, 2014).

El tratamiento hidrotérmico a la semilla agámica de caña de azúcar es un método de manejo que se utiliza en todo el país en los bancos de semilla básica y registrada (Santana *et al.*, 2014); sin embargo, no se logra controlar totalmente esta bacteria producto de su permanencia en hospedantes alternativos, restos de cosecha y plantaciones vecinas.

A pesar de que existe el Servicio Fitosanitario (SEFIT) a la producción, el diagnóstico del raquitismo de los retoños se realiza de forma visual, y no hay un sistema de detección específico que alerte la presencia del patógeno para realizar las medidas de manejo que se requieran en cada caso, por lo que el presente estudio tiene el propósito de establecer la técnica Inmuno Impresión Directa de Tejidos para el diagnóstico masivo de la bacteria causante del raquitismo de los retoños en la caña de azúcar en Cuba y su confirmación por la reacción en cadena de la polimerasa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Establecimiento de la Inmuno Impresión Directa de Tejidos

Se utilizó el primer entrenudo del tercio basal de cuatro tallos de caña de azúcar de los cultivares: positivo CP31-294 (susceptible infectado) y negativo My5514 (sano) (Rufin, 2011) procedentes de la Colección de Germoplasma del Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar en Matanzas. Con un horadador estéril se extrajo un cilindro de cinco centímetros de longitud y uno de diámetro de una sección cercana a la banda de raíces.

Con los cilindros extraídos se realizaron las impresiones sobre las membranas de nitrocelulosa de 0,45 µm (Protran BA85 Nitrocellulose 10401265 Whatman Schleider & Schuell) y se siguió el procesamiento descrito por Funes *et al.* (2012).

Se probaron diferentes diluciones (1/3000, 1/4000 y 1/5000) del anticuerpo específico anti-*L. xyli* subsp. *xyli* (cabra), donado gentilmente por el Dr. Jean-Claude Girard, del Centro Internacional para el Desarrollo Agronómico (CIRAD) en Francia. Para cada combinación del anticuerpo primario con el anticuerpo específico anticabra conjugado con fosfatasa alcalina se utilizaron las diluciones 1/700, 1/800, 1/900 y 1/1000.

Los resultados fueron observados en un estereoscopio con ocular de diez micrómetros. La reacción positiva se confirmó con la aparición de puntos violetas sobre los haces vasculares impresos en las membranas de nitrocelulosa. La prueba se consideró válida cuando el control negativo permaneció incoloro y el positivo desarrolló la reacción característica (puntos violetas).

Confirmación mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa

Se utilizaron 140 cilindros de tallos de caña de azúcar diagnosticados para *L. xyli* por Inmuno Impresión Directa de Tejidos (70 positivos y 70 negativos), que estaban conservados a -20 °C de un muestreo a 14 cultivares en plantaciones comerciales de caña de azúcar (Tabla 1). Se utilizó la combinación de diluciones de los anticuerpos específicos que alcanzó los mejores resultados en el revelado y los cilindros de los tallos de caña de azúcar utilizados en las impresiones.

Los jugos de los cilindros de los tallos fueron obtenidos bajo condiciones asépticas (gabinete de bioseguridad); con una pinza estéril se hizo presión en los cilindros según metodología de Taher (2010).

De los fluidos extraídos se tomó una porción de 200 µL y se centrifugaron a 10 000 rpm. El precipitado se resuspendió en 100 µL de agua destilada estéril. Luego se incubó durante 10 min a 100 °C. El protocolo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa utilizado fue el propuesto por Iglesia *et al.* (2011) con los iniciadores específicos que responden a secuencias únicas de la bacteria *L. xyli* subsp. *xyli*, Cxx-1: 5' CCG AAG TGA GCA GAT TGA CC 3' y Cxx-2: 5' ACC CTG TGT TGT TTT CAA CG 3', diseñados a partir de la región intergénica 23S del RNAr que generan productos de amplificación de 438 pb. Se empleó un marcador de peso molecular de un kb (Promega).

Tabla 1. Cultivares diagnosticados por Inmuno Impresión Directa de Tejidos procedentes de las plantaciones comerciales de caña de azúcar

Cultivares	Muestras positivas	Muestras negativas
C132-81	0	10
SP70-1284	10	0
CP52-43	10	0
C85-102	0	10
C86-56	10	0
C87-252	0	10
C1051-73	5	15
C87-51	10	0
C86-503	5	15
C90-469	10	0
C86-531	0	10
C88-380	10	0
Total	70	70

En el diagnóstico se consideraron verdaderas positivas a las muestras que resultaron positivas por Inmuno Impresión Directa de Tejidos y por Reacción en Cadena de la Polimerasa; verdaderas negativas, las negativas por ambas técnicas, así como falsas positivas, las muestras que resultaron negativas por Reacción en Cadena de la Polimerasa y habían sido diagnosticadas positivas por la técnica serológica; las falsas negativas, a las que habían sido diagnosticadas negativas por Inmuno Impresión Directa de Tejidos y resultaron positivas por la técnica molecular.

Se calcularon según las siguientes expresiones matemáticas referidas por Peralta y Villoch (1999):

$$D-SP = [Vn / (Vn + Fp)] \times 100$$

$$D-SN = [Vp / (Vp + Fn)] \times 100$$

$$E = [Vp + Vn / Vp + Vn + Fp + Fn] \times 100$$

$$\text{Valor predictivo de positividad (Vpp)} = [Vp / (Vp + Fp)] \times 100$$

$$\text{Valor predictivo de negatividad (Vpn)} = [Vn / (Vn + Fn)] \times 100$$

donde:

D-SP: Especificidad del diagnóstico

Vn: Verdaderas negativas

Fp: Falsas positivas

D-SN: Sensibilidad del diagnóstico

Vp: Verdaderas positivas

Fn: Falsas negativas

E: Eficacia

Vpp: Valor predictivo de positividad

Vpn: Valor predictivo de negatividad

RESULTADOS

Inmuno Impresión Directa de Tejidos

La calidad del revelado de las impresiones efectuadas en las membranas de nitrocelulosa de los cultivares CP31-294 (infectado) y My5514 (sano) difiere en dependencia de las combinaciones de diluciones de los anticuerpos específicos anti-*L. xyli* subsp. *xyli* (cabra) y anticabra conjugado con fosfatasa alcalina.

La mejor resolución del revelado se alcanzó con la combinación de los anticuerpos específicos anti-*L. xyli* subsp. *xyli* (cabra) diluido 1/3000 y el anticabra conjugado con fosfatasa alcalina 1/800 por mostrar la mejor resolución del revelado. Por lo tanto, quedó establecida la técnica serológica Inmuno Impresión Directa de Tejidos para la detección de la bacteria *L. xyli* en el cultivo de la caña de azúcar en Cuba con esta combinación de diluciones de los anticuerpos específicos. Los colores nítidos bien definidos observados evidencian la calidad de la determinación y difieren fácilmente entre las muestras infectadas y las sanas (Fig. 1A y B).

Los resultados muestran la efectividad del empleo de la técnica serológica Inmuno Impresión Directa de Tejidos para la detección de la bacteria *L. xyli* en la caña de azúcar y la posibilidad de utilizarla eficientemente en los diagnósticos del raquitismo de los retoños.

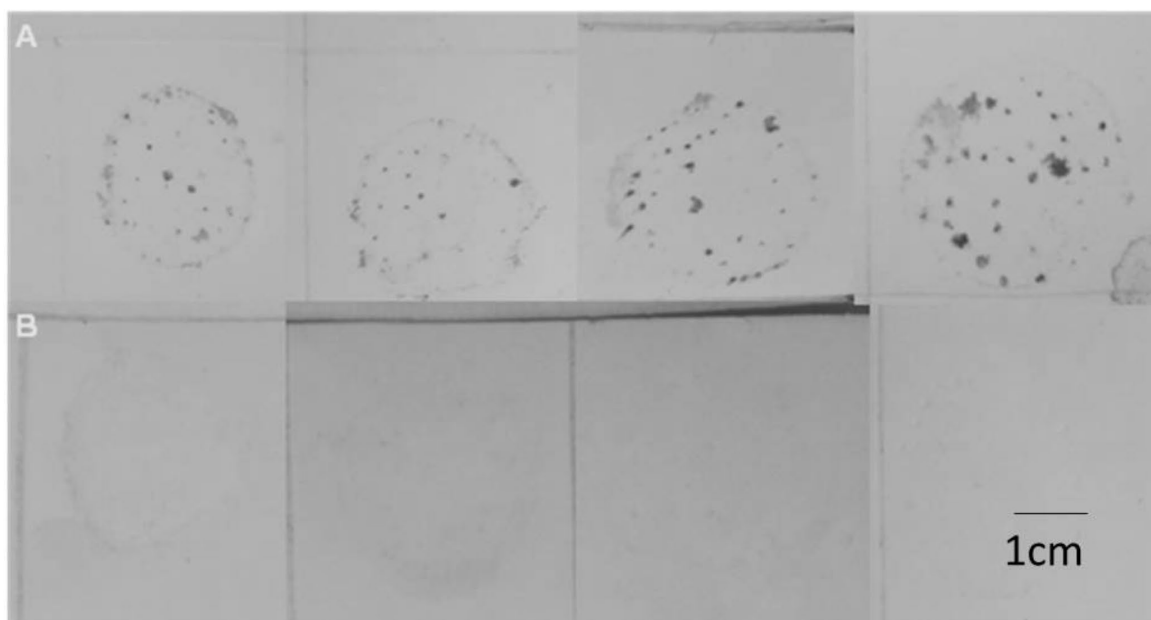


Figura 1. Inmuno Impresión Directa de Tejidos de tallos de caña de azúcar en membranas de nitrocelulosa con la dilución 1/3000 de los anticuerpos específicos anti-*L. xyli* subsp. *xyli* (cabra) con el anticabra conjugado con fosfatasa alcalina 1/800. A: puntos violetas sobre las impresiones del cultivar CP31-294 (control positivo), B: ausencia de puntos violetas sobre las impresiones del cultivar My5514 (control negativo).

Confirmación mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa

El protocolo para la detección de *L. xyli* en caña de azúcar por Reacción en Cadena de la Polimerasa

funcionó adecuadamente, lo que se corroboró con la obtención del producto de la talla esperada (438 pb) (Fig. 2). Las líneas 1, 3, 8, 11 y 12 son muestras negativas a la bacteria; las 2, 4, 5, 6, 7, 9 y 10 son positivas, y la 13 es el marcador de peso molecular.

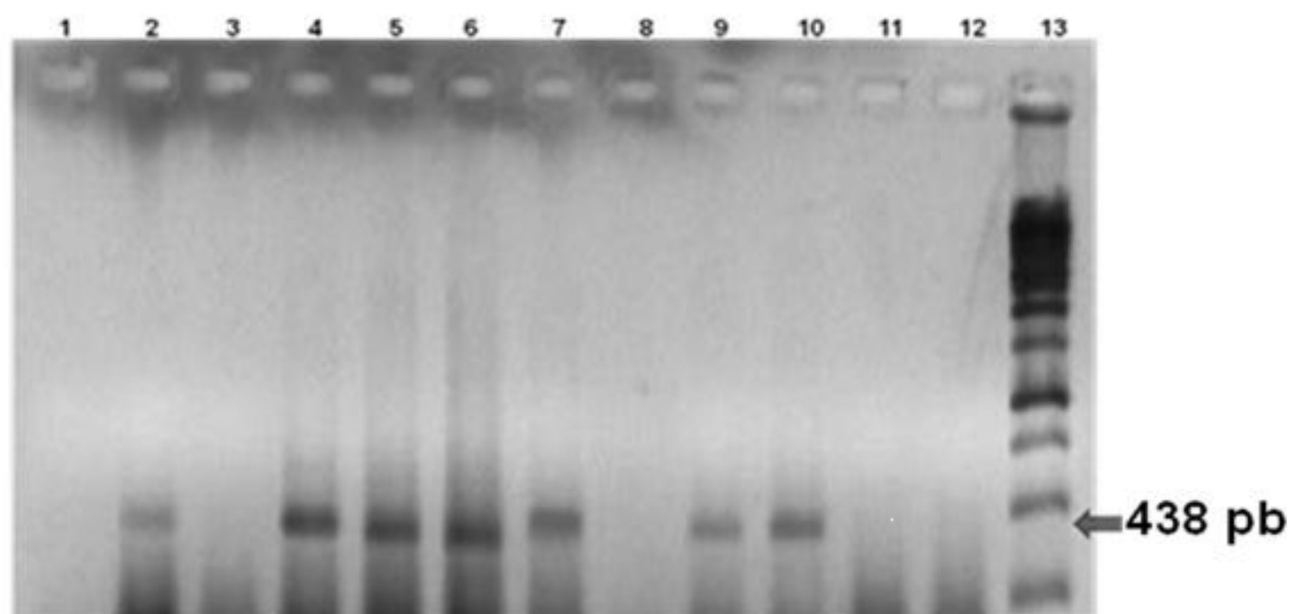


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % de los productos de la amplificación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa de *L. xyli* en jugos de caña de azúcar. Línea 1: control negativo; línea 2: cultivar CP31-294; línea 3: cultivar My5514; línea 4: cultivar C86-56; línea 5: cultivar C87-51; línea 6: cultivar C88-380; línea 7: cultivar C90-469; línea 8: cultivar C132-81; línea 9: cultivar CP52-43; línea 10: cultivar SP70-1284; línea 11: cultivar C85-102; línea 12: cultivar C86-531; línea 13: marcador de peso molecular (1 kb, Promega).

De los 70 cilindros de tallos de caña de azúcar positivos y 70 negativos a *L. xyli* diagnosticados por Inmuno Impresión Directa de Tejidos, en todos los casos coincidió el resultado del diagnóstico de las muestras. Solamente dos del cultivar C86-503, que habían resultado negati-

vas fueron diagnosticadas positivas por la técnica molecular. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se estimaron los parámetros de desempeño, especificidad, sensibilidad, eficiencia y valores predictivos positivos y negativos del diagnóstico por ambas técnicas (Tabla 2).

Tabla 2: Parámetros de desempeño del diagnóstico por Inmuno Impresión Directa de Tejidos y la Reacción en Cadena de la Polimerasa para la detección de *L. xyli*

<i>Indicadores de validación</i>	<i>Valores determinados por reacción en cadena de la polimerasa con respecto al diagnóstico por Inmuno Impresión Directa de Tejidos</i>
Especificidad del diagnóstico	100
Sensibilidad del diagnóstico	97,30
Eficacia	98,59
Valor predictivo de positividad	100
Valor predictivo de negatividad	97,14

Todos los parámetros de desempeño se mantuvieron por encima del 97 %, por lo que se pudo corroborar la alta correspondencia que existe entre los resultados del diagnóstico de las muestras por Inmuno Impresión Directa de Tejidos y Reacción en Cadena de la Polimerasa. Este resultado muestra la eficacia de la Inmuno Impresión Directa de Tejidos en la detección de la bacteria *L. xyli* en el cultivo de la caña de azúcar con un 100 % de especificidad.

Los resultados de las muestras analizadas por ambas técnicas tuvieron el 98,57 % de coincidencia. Además, con la técnica de diagnóstico serológico Inmuno Impresión Directa de Tejidos se pudieron obtener resultados de alta sensibilidad (97,30 %) y especificidad (100 %), lo que la convierten en la alternativa de mayor preferencia para la detección rápida y económica de *L. xyli* en las plantaciones de caña de azúcar.

DISCUSIÓN

La Inmuno Impresión Directa de Tejidos ha sido empleada eficientemente en la detección de agentes nocivos en diferentes cultivos como papa (*Solanum tuberosum* Linnaeus) (Franco *et al.*, 2009), cítricos (*Citrus* spp. Linnaeus) (Peña *et al.*, 2010), frijol (*Phaseolus vulgaris* Linnaeus), pepino (*Cucumis sativus* Linnaeus), pimiento (*Capsicum annuum* Linnaeus) y tomate (*Solanum Lycopersicum* Linnaeus) (Sepúlveda, 2013).

Esta técnica es ampliamente utilizada en el diagnóstico masivo de agentes nocivos en caña de azúcar, como *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Funes *et al.*, 2012), bacterias como *Xanthomonas albilineans* (Garcés *et al.*, 2013) y virus de la hoja amarilla (Aday *et al.*, 2014) y con alta sensibilidad y confiabilidad.

Garcés *et al.* (2013) la utilizaron en el diagnóstico de *L. xyli* en el sistema cuarentenario para la importación segura de cultivares en Ecuador, en el esquema de producción de semilla sana y en la detección de esta bacteria como criterio de selección en el Programa de Obtención de Nuevos Cultivares.

Las técnicas moleculares son más sensibles que las serológicas, lo cual ha sido ampliamente documentado, pero tienen como inconvenientes altos requerimientos de infraestructura, costos de equipamiento y consumo de reactivos (Fontana *et al.*, 2013); en tanto, las técnicas serológicas son más baratas y se puede procesar un número mayor de muestras diariamente, mientras que proporciona una sensibilidad y especificidad aceptable (Zardón *et al.*, 2012).

Según Monteiro (2013), la notable especificidad y sensibilidad de la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa se encuentra en el intervalo de los índices establecidos para fitopatógenos, los que además la califican como satisfactoria para la detección de la bacteria *L. xyli*, a partir de extractos vegetales de tallos de caña de azúcar, con límites de detección y amplificación hasta la dilución de 10^{-3} UFC • mL⁻¹.

Los resultados de este estudio demuestran la posibilidad de utilizar la Inmuno Impresión Directa de Tejidos para la detección de la bacteria *L. xyli* en la caña de azúcar, mediante un procedimiento simple que permite analizar gran número de muestras en poco tiempo, con bajo costo y alta confiabilidad.

CONCLUSIONES

- Quedó establecida la técnica Inmuno Impresión Directa de Tejidos para el diagnóstico masivo de la bacteria *L. xyli* en la caña de azúcar en Cuba.
- Los parámetros de desempeño calculados muestran la efectividad del empleo de la técnica Inmuno Impresión Directa de Tejidos para la detección de *L. xyli* en la caña de azúcar.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jean-Claude Girard, del Centro Internacional para el Desarrollo Agronómico (CIRAD) en Francia, quien donó el anticuerpo específico anti-*Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (cabra); a los especialistas del Servicio Fitosanitario de la Caña de Azúcar de las provincias, y a los de la red de estaciones del Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar de Cuba que colaboraron en la colecta de las muestras

REFERENCIAS

- Aday, O.; M. La O; M. Zardón; E. Rodríguez; J. Mesa; Y. Puchades; J. Delgado; F. Díaz. 2014. Distribución del virus de la hoja amarilla de la caña de azúcar en Cuba. *Revista Protección Vegetal*. ISSN 1010-2752. Volumen 29 (3): 177-184.
- Alvez B.; M. Oropeza; G. Alonso. 2016. *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, patógeno de la caña de azúcar en Venezuela agente causal del raquitismo de los retoños de la caña de azúcar. España. Editorial Academica Espanola, ISBN 978-3-659-70296-9. 120 p.
- Franco, L.; C. Andrés; M. Guzmán. 2009. "Detección del virus PVX, PVS, PVY y PLRV en la colección central colombiana de papa por medio de la técnica inmuno (IMI)". *Facultad de Ciencias Básicas*. ISSN 1900-4699. Volumen 5 (1): 130-139.
- Fontana, P.; V. Di; R. Sopena. 2013. Cultivo de caña de azúcar. *La gaceta*. Argentina, marzo 22: 12 p.
- Funes, C.; R. Bertani; I. Cazón; C. Kairuz; V. González; L. Ploper. 2012. "Estado sanitario de lotes comerciales de caña de azúcar destinados a la obtención de caña semilla durante el periodo 2008–2011 en Tucumán, R. Argentina". *EEAOC. Avance Agroindustrial*. Argentina. 33 (1): 8-12.
- Garcés, F.; F. Fiallos; J. Mendoza; E. Silva; R. Castillo; M. Valdez; I. Viteri. 2013. Manejo preventivo del raquitismo de la soca (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*), escaldadura de la hoja (*Xanthomonas albilineans*) y la hoja amarilla (*Sugarcane yellow leaf virus*, SCYLV) de la caña de azúcar (*Saccharum* spp.) en Ecuador. *Memorias del III Congreso AETA*, Guayaquil-Ecuador. Septiembre 18 al 20 del 2013: 26 p.
- García, J. 2014. Diagnóstico de *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson y *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* en caña de azúcar en la Chontalpa. Tabasco. Tesis (en opción al título académico de Máster en Ciencias, especialista en Producción Agroalimentaria en el Trópico). Colegio de Postgraduados México. 79 p.
- Iglesia, A.; M. Díaz; M. Ramos. 2011. "Validación de técnicas para el diagnóstico del raquitismo en los retoños de la caña de azúcar en Cuba". *ATAC (CU)*. ISSN 0138-7553 (3): 18-23.
- Monteiro, M. 2013. Termoterapia asociada al cultivo de tejidos para la obtención de plantas de caña de azúcar de la variedad SP80-3280 libres de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. Sao Paulo. Tesis (en opción al título académico de Máster en Agronomía), Universidad Sao Paulo. 76 p.
- Peña, I.; J. Pérez; D. López; L. Batista. 2010. Principales enfermedades virales y afines de los cítricos. *European Journal of Plant Pathology*. (110): 175-190.
- Peralta, E.; A. Villoch. 1999. Validación de ensayos inmunoquímicos y moleculares utilizados para el diagnóstico de fitopatógenos. Resúmenes del XXVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología y X Congreso de la Asociación Latinoamericana de Fitopatología. Guadalajara, México.
- Pérez, H.; I. Santana; I. Rodríguez. 2013. *Manejo sostenible de tierras en la producción de caña de azúcar*. La Habana, Cuba. 290 p.
- Rufin, Y. 2011. Raquitismo de los retoños de la caña de azúcar: resistencia varietal y comparación de métodos de evaluación. La Habana. Tesis (en opción al título académico de Máster en Sanidad Vegetal). Universidad Agraria de La Habana. 58 p.
- Santana, I.; M. González; R. Crespo; S. Guillen. 2014. Instructivo técnico para el manejo de la caña de azúcar. La Habana. INICA. 302 p.
- Sepúlveda, P. 2013. "Trasmisión de virus por semillas". *Tierra Adentro*. NR25776 (2): 18-21.
- Silva, H. 2013. "Enfermedades bacterianas asociadas a caña de azúcar". México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. Vol. (31) (Suplemento): 63-64.
- Taher, K. 2010. Bases metodológicas para el manejo integrado del raquitismo de los retoños de la caña de azúcar en Irán. Santa Clara. Tesis (en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas), Universidad Central de las Villas. 107 p.
- Zardón, M.; A. Gallo; J. Mesa; A. Arencibia; L. Zamora; Y. Martínez; M. Sautié; M. Casas; M. La O. 2012. "Detección de infecciones mixtas en genotipos de caña de azúcar en Cuba". *Revista Protección Vegetal*. Vol. 27 (2): 77-84.