

Actividad enzimática de dehidroascorbato reductasa en diferentes tejidos de plántulas de *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh (camu camu)

Enzymatic activity of dehydroascorbate reductase in different tissues of seedlings of *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh (camu camu)

Anthony J. Fasabi¹, Alex Tapullima¹, Jorge L. Marapara¹, Sixto A. Imán² y Juan C. Castro³

Recibido: julio 2016

Aceptado: septiembre 2016

RESUMEN

Myrciaria dubia (camu camu) es un frutal amazónico que se caracteriza por acumular en sus frutos altas cantidades de ácido L-ascórbico (vitamina C). No obstante, existe variación en la producción de esta vitamina, la que podría atribuirse a la actividad catalítica diferencial de enzimas de las vías Smirnov-Wheeler y Halliwell-Asada. Particularmente, en esta última vía la enzima dehidroascorbato reductasa (DHAR, E.C. 1.8.5.1) se encarga de regenerar la vitamina C a partir de dehidroascorbato, consecuentemente podría estar cumpliendo un rol fundamental en *M. dubia*. Por tal motivo, el objetivo de esta investigación fue comparar la actividad de la enzima DHAR en raíces, semillas, tallos y hojas de plántulas de *M. dubia*. Las plántulas fueron obtenidas previa germinación de semillas en condiciones controladas. A partir de las semillas y plántulas se obtuvieron los tejidos, se preparó un extracto enzimático y evaluó la actividad catalítica de DHAR sobre la base de protocolos previamente reportados. La actividad de la enzima DHAR mostró diferencias significativas entre los tejidos analizados de las plántulas ($F = 92,607$; $gl = 3$; $P < 0,001$), encontrándose la mayor actividad catalítica en las semillas ($1,06 \pm 0,001 \mu\text{mol.mg prot}^{-1}.\text{min}^{-1}$), mientras que en las hojas se registraron los valores más bajos ($0,039 \pm 0,005 \mu\text{mol.mg prot}^{-1}.\text{min}^{-1}$). En conclusión, la actividad catalítica de DHAR muestra diferencias estadísticas significativas entre los tejidos analizados de *M. dubia*; estas variaciones se pueden atribuir a la biosíntesis diferencial de esta enzima, que puede estar asociada con las necesidades fisiológicas particulares de cada tipo de tejido.

Palabras claves: frutal amazónico, Halliwell-Asada, oxidorreductasa, vitamina C.

ABSTRACT

Myrciaria dubia (camu camu) is an Amazonian fruit characterized by store high quantities of L-ascorbic acid (vitamin C). However, there is considerable variation in the production of this vitamin, which could be attributed to the differential catalytic activity of enzymes of the Smirnov-Wheeler and Halliwell-Asada pathways. Particularly, in the last pathway, dehydroascorbate reductase (DHAR, E.C. 1.8.5.1) regenerates vitamin C from dehydroascorbate, consequently it could be fulfilling a fundamental role in *M. dubia*. Therefore, the aim of this research was to compare DHAR catalytic activity among roots, seeds, stems, and leaves of seedlings of *M. dubia*. Seedlings were collected after seeds germination under controlled conditions. Tissues were obtained from seeds and seedlings, an enzymatic extract was prepared and DHAR catalytic activity was assayed with protocols previously reported. DHAR catalytic activity showed statistically significant differences among seedlings tissues ($F = 92,607$; $gl = 3$; $P < 0,001$), being reported the highest catalytic activity in seeds ($1,06 \pm 0,001 \mu\text{mol.mg prot}^{-1}.\text{min}^{-1}$), whereas leaves recorded the lowest values ($0,039 \pm 0,005 \mu\text{mol.mg prot}^{-1}.\text{min}^{-1}$). In conclusion, DHAR catalytic activity display significant

¹ Unidad Especializada de Biotecnología (UEB). Centro de Investigaciones de Recursos Naturales de la Amazonía (Cirna). Universidad Nacional de la Amazonia Peruana (UNAP). San Juan Bautista, Loreto, Perú.

² Área de Conservación de Recursos Fitogenéticos. Estación Experimental San Roque. Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA). San Juan Bautista, Loreto, Perú.

³ UEB. Cirna. UNAP. Pasaje Los Paujiles s/n, Nuevo San Lorenzo, San Juan Bautista, Loreto, Perú. juan.castro@unapiquitos.edu.pe

differences among analyzed tissues of *M. dubia*, these variations can be attributed to the differential biosynthesis of this enzyme, which may be associated with particular physiological needs of each tissue type.

Key words: amazonian fruit, Halliwell-Asada, oxidoreductase, vitamin C.

INTRODUCCIÓN

La vitamina C (ácido L-ascórbico) cumple múltiples funciones en la conservación de la salud humana. Por ejemplo, es esencial para el buen funcionamiento del sistema inmunológico (Campbell *et al.*, 1999; Douglas *et al.*, 2007; Thomas y Holt, 1978). Asimismo, en conjunto con la vitamina E, coenzima Q y el β -caroteno constituyen un excelente sistema antioxidante que permiten eliminar los radicales libres (Lynch y Cook, 1980). También, participa en el metabolismo de los lípidos (Padayatty *et al.*, 2003) y como coenzima juega un papel fundamental en la biosíntesis del colágeno (Martin y Frei, 1997); por este rol se considera indispensable para la prevención de enfermedades como la artritis y artrosis. Por último, cabe señalar que las investigaciones realizadas por el dos veces Premio Nobel Linus Carl Puling conjuntamente con Ewan Cameron (Cameron y Pauling, 1976, 1973; Kratzing *et al.*, 1982; Sayed *et al.*, 1975; Schreiber y Trojan, 1991) y otros científicos (Agus *et al.*, 1999; Cameron, 1982; Cameron y Pauling, 1978; Drake *et al.*, 1996; Lupulescu, 1994; Roomi *et al.*, 1998) indican que una alimentación rica en vitamina C ofrece una protección suplementaria contra varios tipos de cáncer.

Una excelente fuente de esta importante vitamina son los frutos de *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh (camu camu), pues estos presentan altos contenidos (hasta 3 g de vitamina C/100 g de pulpa) de ácido L-ascórbico (vitamina C), lo que equivale a casi treinta veces con respecto al zumo de los cítricos como la naranja, limón y mandarina.

Además, contiene diversos compuestos antioxidantes (Correa *et al.*, 2011). Por tanto, tiene proyecciones para convertirse en un frutal nativo con gran potencial económico en la Amazonía peruana. Sin embargo, una de las principales dificultades que presenta *M. dubia* es la amplia variación en la producción de vitamina C (Castro *et al.*, 2013). Esta variación puede atribuirse a la actividad catalítica diferencial de enzimas de la vía Smirnoff-Wheeler y también, probablemente a la actividad diferencial de las enzimas de la vía de Halliwell-Asada (vía ascorbato-glutatión).

Las enzimas involucradas en la vía de Halliwell-Asada están estrechamente relacionadas con el contenido de vitamina C. Pues algunos reportes muestran que la expresión de enzimas claves de esta vía son monodehidroascorbato reductasa y dehidroascorbato reductasa (DHAR) (Grantz *et al.*, 1995). Asimismo, el contenido de vitamina C puede disminuir significativamente si las formas oxidadas (monodehidroascorbato y dehidroascorbato) no son convertidas en ácido L-ascórbico por la acción complementaria de estas dos enzimas (Smirnoff y Wheeler, 2000). Adicionalmente, el contenido de vitamina C puede ser incrementado por una mayor actividad de estas enzimas (Chen *et al.*, 2003). Finalmente, la enzima DHAR que cataliza la reducción del dehidroascorbato a ácido L-ascórbico (figura 1) contribuye con el mantenimiento de los niveles constantes de esta vitamina en las plantas (Chen y Gallie, 2005, 2006) y ligeros cambios en su actividad afectan el contenido total de vitamina C y por ende en el estado redox del citosol y el apoplasto (Chen y Gallie, 2005).

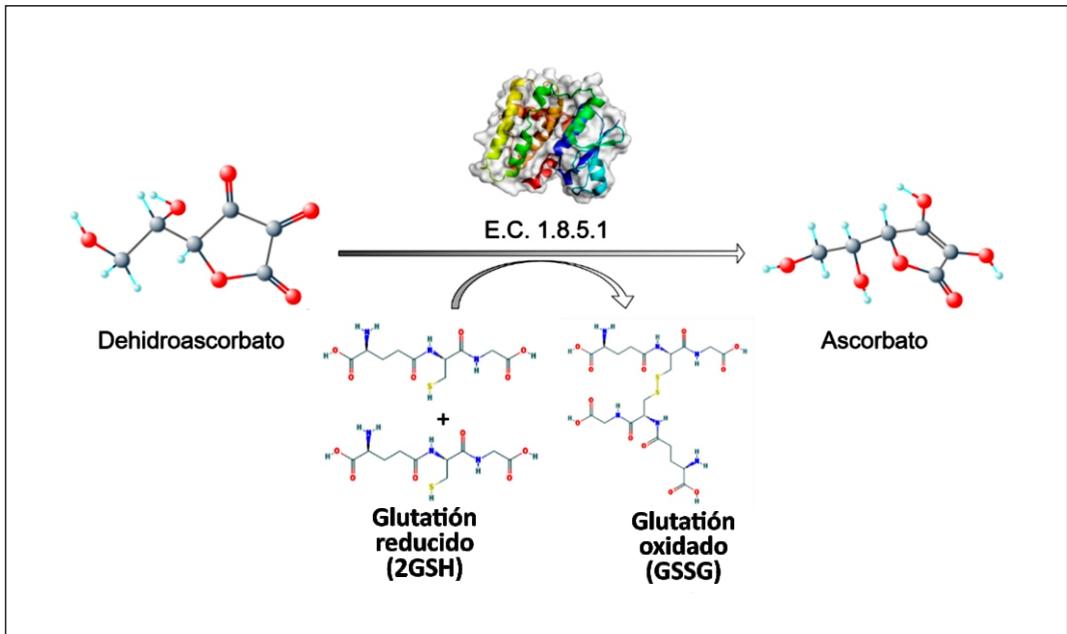


Figura 1. Actividad catalítica de la enzima dehidroascorbato reductasa (E.C. 1.8.5.1) para la formación de ascorbato (vitamina C) a partir de dehidroascorbato.

Por tanto, debido al importante rol bioquímico de DHAR en las plantas, específicamente en la formación de vitamina C, es posible que variaciones en la actividad de esta enzima también pueden influir en el contenido de vitamina C en *M. dubia*. Consecuentemente, para generar más conocimiento científico básico de esta enzima en este frutal nativo, el objetivo de esta investigación, realizada entre enero y marzo de 2016, fue comparar la actividad de la enzima DHAR en raíces, semillas, tallos y hojas de plántulas de *M. dubia*.

MATERIAL Y MÉTODO

Material botánico

Cien frutos maduros fueron obtenidos al azar de diez plantas de *M. dubia* de la Colección Nacional de Germoplasma, Campo Experimental El Dorado, Estación Experimental Agraria San Roque - Loreto del Instituto Nacional de

Innovación Agraria (INIA); ubicado en el kilómetro 25,5 de la carretera Iquitos-Nauta (3°57'22,95"S y 73°24'46,91"O). El material fue debidamente rotulado y transportado en refrigeración y protegido de la luz hasta la Unidad Especializada de Biotecnología, Centro de Investigaciones de Recursos Naturales de la Amazonía (Cirna), situado en pasaje Los Paujiles s/n, Nuevo San Lorenzo, San Juan Bautista, Loreto.

Germinación y crecimiento inicial

Las semillas fueron extraídas de los frutos y lavadas meticulosamente con agua destilada, posteriormente fueron escarificadas con un bisturí en la zona del embrión. Este procedimiento permitió acelerar notablemente el proceso de germinación. Luego, estas fueron puestas entre dos capas de gasa empapadas con agua destilada y transferidas a un recipiente de plástico y mantenidas en una cámara de climatización a 30 ± 1 °C, 92% de

humedad relativa y en oscuridad; después de ocurrida la germinación (aprox. tres semanas) y la plántula presentó radícula y plúmula, fue transferida al ambiente de cultivo por cuatro semanas más con un fotoperiodo de 12 h luz/12 h oscuridad. A partir de la décima semana de incubación se obtuvieron las plántulas apropiadas para los ensayos.

Preparación de extractos enzimáticos

Las muestras de semillas, raíz, tallo y hojas fueron obtenidas de las plántulas y fueron lavadas con agua destilada y agua ultrapura. En el caso de las semillas también se removió la

testa. Luego se procedió a preparar los extractos enzimáticos de DHAR según Ma y Cheng (2003) y Grace y Logan (1996), con algunas modificaciones. Brevemente, el protocolo consistió de los siguientes pasos: 1) se transfirió 400 mg de la muestra vegetal a un mortero previamente enfriado, se agregó 1 mL de tampón de extracción (50 mM KH_2PO_4 pH 7,5; 0,1 mM EDTA, 0,3% Triton X-100 y 4% de polivinilpirrolidona) y procedió a homogenizar; 2) el homogenizado se transfirió a un microtubo y centrifugó a $13\ 000 \times g$ por 10 min a $4\ ^\circ\text{C}$ (figura 2). El sobrenadante fue transferido a un microtubo y conservado a $4\ ^\circ\text{C}$ para posteriores ensayos.

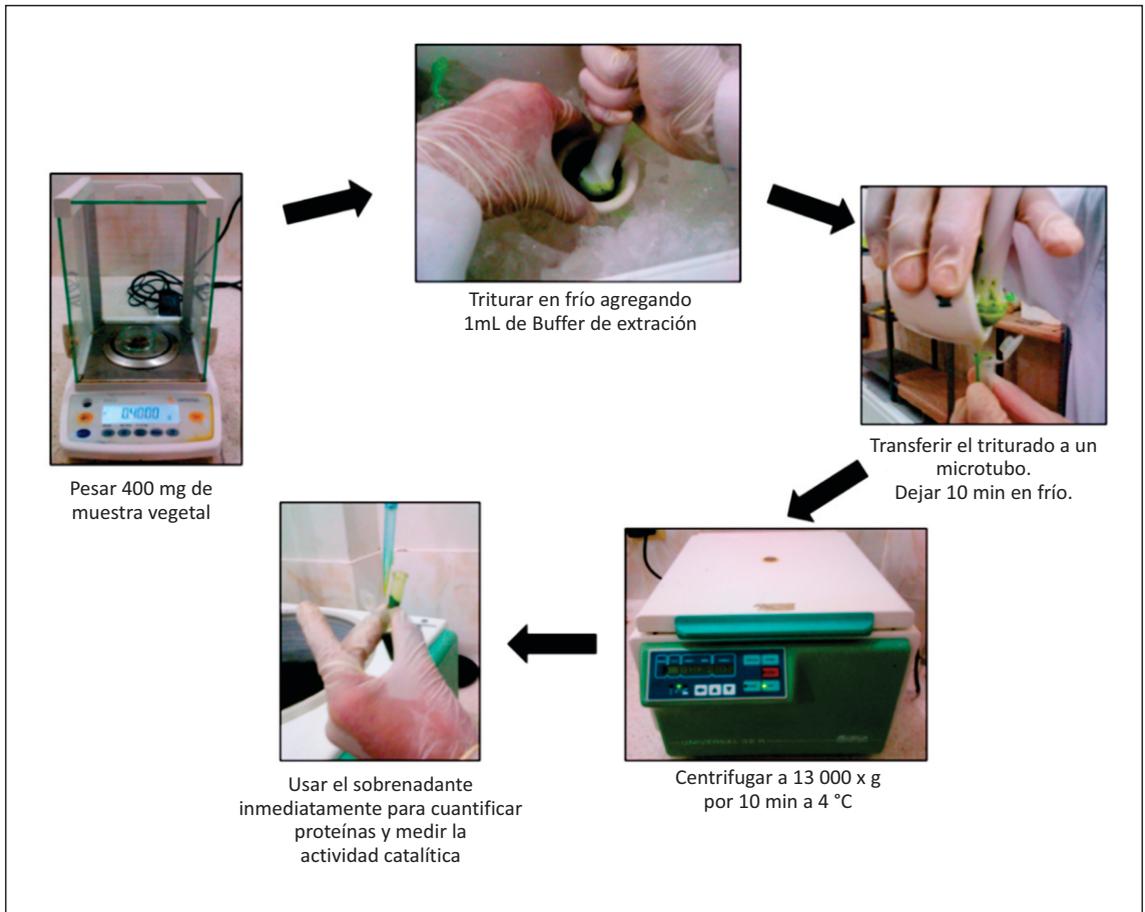


Figura 2. Flujograma para la preparación del extracto enzimático de DHAR a partir de diferentes tejidos de plántulas de *M. dubia*.

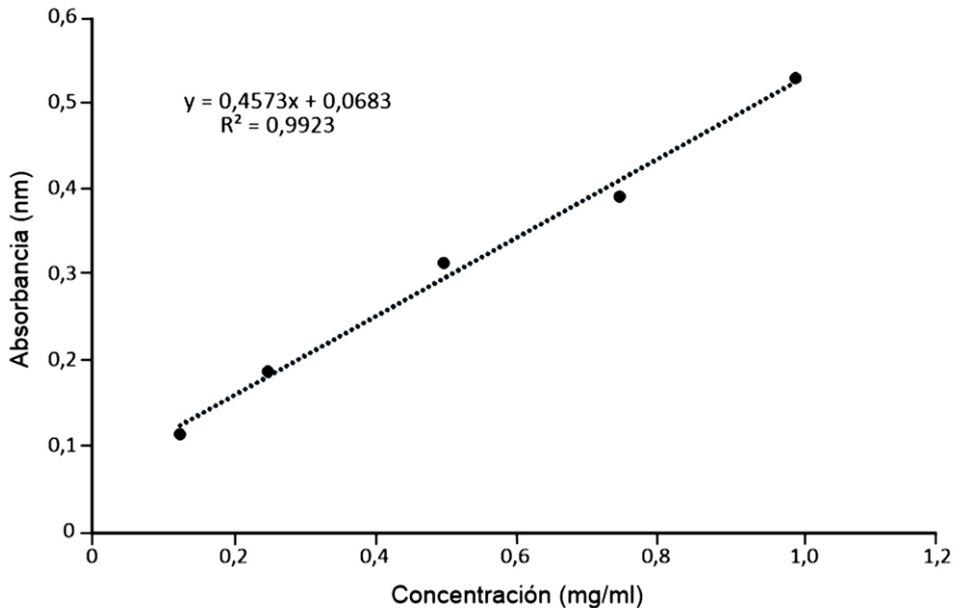


Figura 3. Curva de calibración obtenida para la cuantificación de proteínas totales en los extractos enzimáticos de DHAR obtenido de diferentes tejidos de plántulas de *M. dubia*.

Cuantificación de proteínas totales

Se realizó sobre la base del método descrito por Bradford (1976). Se prepararon soluciones estándares de albúmina de suero bovino (0,125 - 1,0 mg/mL) y se transfirió 10 μ L de cada estándar a un microtubo que contenía 1 mL del reactivo de Bradford (0,01% azul brillante de Coomassie G-250, 5% de etanol absoluto y 10% de ácido fosfórico), 50 μ L de NaOH 1 N, se incubó a 25 °C por 10 min y registraron las absorbancias a 596 nm en un espectrofotómetro UV/Vis (ThermoSpectronic, Genesys 6,0). Con los datos obtenidos se hizo un gráfico para obtener la ecuación de la recta ($y = 0,4573 x + 0,0683$, donde y es la absorbancia de la muestra y x la concentración de la proteína en mg/mL) y sobre la base de esta ecuación se determinó la concentración de proteínas en la muestra con base en las lecturas de absorbancia obtenidas con el procedimiento previamente descrito (figura 3).

Medición de la actividad catalítica de DHAR

La medición de la actividad catalítica se realizó según Ma y Cheng (2003) con algunas modificaciones. Brevemente, los pasos fueron: en un microtubo se añadió 1 mL del tampón enzimático (500 mM HEPES pH 7,0; 5 mM EDTA, 100 mM glutatión reducido, 50 mM de dehidroascorbato [$\epsilon = 14 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]). La reacción se inició con la adición de 5 μ L del extracto enzimático y se registraron los valores de absorbancia a 265 nm cada 5 s por 10 min usando un espectrofotómetro UV/Vis (ThermoSpectronic, Genesys 6,0).

Análisis estadístico

Los datos generados fueron almacenados en una hoja de cálculo de Microsoft® Excel 2016. El archivo fue guardado con formato CSV (delimitado por comas) para su posterior procesamiento estadístico. Los análisis estadísticos

(promedios, error estándar de la media, ANOVA y HSD de Tukey) se realizaron empleando el programa R v 3.0.0. (R Core Team, 2013).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La enzima DHAR presentó diferencias estadísticas significativas ($F = 92,607$; $gl = 3$; $P < 0,001$) en su actividad catalítica en los tejidos analizados de plántulas de *M. dubia*. Tal como se observa en la figura 4, las semillas mostraron las actividades más altas ($1,060 \pm 0,001 \mu\text{mol.mg prot}^{-1}.\text{min}^{-1}$), seguidas por las raíces ($0,640 \pm 0,141 \mu\text{mol.mg prot}^{-1}.\text{min}^{-1}$). En contraste, las actividades enzimáticas más bajas se reportaron en los tallos y hojas con valores menores de $0,100 \mu\text{mol.mg prot}^{-1}.\text{min}^{-1}$. Estudios realizados por Acuña *et al.* (2015) muestran que DHAR también presenta actividad catalítica diferencial tanto en la cáscara como en la pulpa de los frutos de *M. dubia*; también estos investigadores reportaron que los genotipos que presentan mayor actividad

catalítica de esta enzima también acumulan más vitamina C en sus frutos. Estos resultados se sustentan con el rol clave de esta enzima en el reciclaje de vitamina C y por ende en su acumulación en los diferentes tejidos de las plantas (Chen y Gallie, 2006; May *et al.*, 1997).

Las marcadas diferencias en la actividad enzimática de DHAR en los tejidos de plántulas de *M. dubia* pueden estar vinculadas con la función que realizan, el tipo de semilla, el tipo de germinación (Vásquez *et al.*, 1997) y el estado de desarrollo de los tejidos. Según Stevens *et al.* (2008) existe una correlación positiva entre la actividad de las enzimas del reciclaje de la vitamina C y los niveles de la misma, aunque en este estudio específico no podemos conocer si existe esta relación, porque no medimos los niveles de vitamina C en los tejidos analizados. Nuestros resultados parcialmente coinciden con lo manifestado por otros investigadores, quienes indican que los niveles de vitamina C son mayores en tejidos fotosintéticos, en los frutos y órganos de almacenamien-

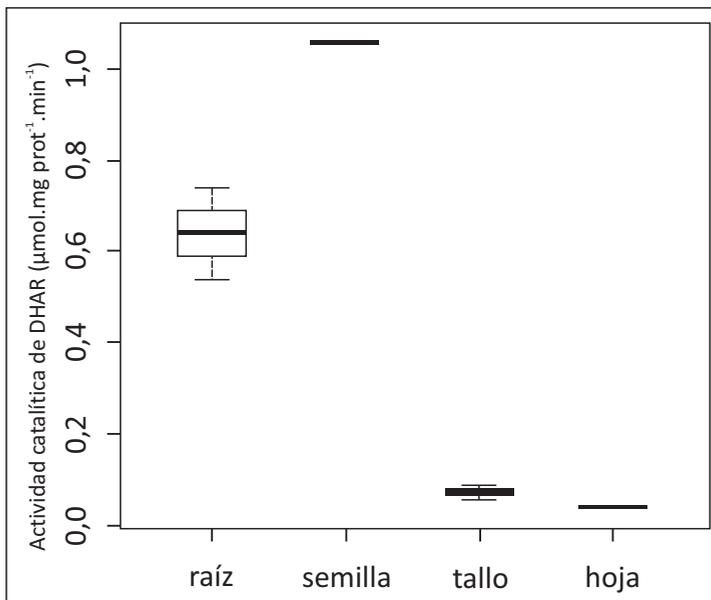


Figura 4. Actividad catalítica de la enzima DHAR en diferentes tejidos de plántulas de *M. dubia*.

to, en parte por la actividad catalítica de enzimas de la vía Halliwell-Asada (Foyer y Noctor, 2000; Noctor y Foyer, 1998).

Por otro lado, los resultados obtenidos en nuestra investigación son similares a estudios previos realizados en otras especies de plantas. Por ejemplo, los análisis realizados en hojas adultas de tomate (*Lycopersicon sculentum*) muestran una actividad catalítica de DHAR equivalente a $1,46 \pm 0,06$ mmol.mg⁻¹ peso fresco min⁻¹ (Mittova *et al.*, 2000) y en hojas de maíz (*Zea mays*) reportan actividades de $5,76 \pm 0,53$ μmol min⁻¹ mg⁻¹ clorofila (Kingston-Smith y Foyer, 2000). Aunque no es posible indicar en cuál de estas especies hay mayor actividad de la enzima DHAR, porque en estas investigaciones la actividad de la enzima se midió con diferentes unidades, pero sí se puede evidenciar que esta enzima está conservada en las especies vegetales, aún de grupos filogenéticos distantes. Esto se atribuye al rol antioxidante de este sistema enzimático que garantiza la viabilidad de las células vegetales (Foyer y Halliwell, 1976; Mittova *et al.*, 2000; Noctor y Foyer, 1998).

CONCLUSIONES

La actividad catalítica de DHAR muestra diferencias estadísticas significativas entre los tejidos analizados de *M. dubia*; estas variaciones se pueden atribuir a la biosíntesis diferencial de esta enzima, que puede estar asociada con las necesidades fisiológicas particulares de cada tipo de tejido.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acuña C, Cerdeira LA, Ramírez R, Cobos M, Marapara JL, Angulo J, Imán SA, Castro JC. 2015. Actividad catalítica diferencial de enzimas del ciclo ascorbato-glutatión en los frutos de dos genotipos de *Myrciaria dubia*. Conoc. amaz. 6, 121-128.
- Agus DB, Vera JC, Golde DW. 1999. Stromal cell oxidation: a mechanism by which tumors obtain vitamin C. Cancer Res. 59, 4555-4558.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.
- Cameron E. 1982. Vitamin C and cancer: an overview. Int J Vitam Nutr Res. Suppl23, 115-127.
- Cameron E, Pauling L. 1978. Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: Reevaluation of prolongation of survival times in terminal human cancer. PNAS. 75, 4538-4542.
- Cameron E, Pauling L. 1976. Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: Prolongation of survival times in terminal human cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 3685-3689.
- Cameron E, Pauling L. 1973. Ascorbic acid and the glycosaminoglycans. An orthomolecular approach to cancer and other diseases. Oncology 27, 181-192.
- Campbell JD, Cole M, Bundittravorn B, Vella AT. 1999. Ascorbic acid is a potent inhibitor of various forms of T cell apoptosis. Cell. Immunol. 194, 1-5.
- Castro JC, Gutiérrez F, Acuña C, Cerdeira LA, Tapullima A, Cobos M, Imán SA. 2013. Variación del contenido de vitamina C y antocianinas en *Myrciaria dubia* (camu camu). Rev Soc Quím Perú, 79(4), 319-330.
- Chen Z, Gallie DR. 2006. Dehydroascorbate reductase affects leaf growth, development, and function. Plant Physiol. 142, 775-787.

- Chen Z, Gallie DR. 2005. Increasing Tolerance to Ozone by Elevating Foliar Ascorbic Acid Confers Greater Protection against Ozone Than Increasing Avoidance. *Plant Physiol.* 138, 1673-1689.
- Chen Z, Young TE, Ling J, Chang S-C, Gallie DR. 2003. Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling. *PNAS.* 100, 3525-3530.
- Correa SI, Freyre SP, Aldano MM. 2011. Caracterización morfológica y evaluación de la colección nacional de germoplasma de camu camu *Myrciaria dubia* (HBK) Mc Vaugh del INIA Loreto, Perú. *Sci. Agropecu.* 2, 189-201.
- Douglas RM, Hemilä H, Chalker E, Treacy B. 2007. Vitamin C for preventing and treating the common cold. *Cochrane Database Syst Rev.* (3):CD000980.
- Drake IM, Davies MJ, Mapstone NP, Dixon MF, Schorah CJ, White KL, Chalmers DM, Axon AT. 1996. Ascorbic acid may protect against human gastric cancer by scavenging mucosal oxygen radicals. *Carcinogenesis.* 17, 559-562.
- Foyer CH, Halliwell B. 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta.* 133, 21-25.
- Foyer CH, Noctor G. 2000. Tansley Review nº 112. Oxygen Processing in Photosynthesis: Regulation and Signalling. *The New Phytologist.* 146, 359-388.
- Grace SC, Logan BA. 1996. Acclimation of Foliar Antioxidant Systems to Growth Irradiance in Three Broad-Leaved Evergreen Species. *Plant Physiol.* 112, 1631-1640.
- Grantz AA, Brummell DA, Bennett AB. 1995. Ascorbate free radical reductase mRNA levels are induced by wounding. *Plant Physiol.* 108, 411-418.
- Kingston-Smith AH, Foyer CH. 2000. Over-expression of Mn-superoxide dismutase in maize leaves leads to increased monodehydroascorbate reductase, dehydroascorbate reductase and glutathione reductase activities. *J. Exp. Bot.* 51, 1867-1877.
- Kratzing CC, Kelly JD, Oelrichs BA. 1982. Ascorbic Acid in Neural Tissues. *J Neurochem.* 39, 625-627.
- Lupulescu A. 1994. The role of vitamins A, beta-carotene, E and C in cancer cell biology. *Int J Vitam Nutr Res.* 64, 3-14.
- Lynch SR, Cook JD. 1980. Interaction of vitamin C and iron. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 355, 32-44.
- Ma F, Cheng L. 2003. The sun-exposed peel of apple fruit has higher xanthophyll cycle-dependent thermal dissipation and antioxidants of the ascorbate-glutathione pathway than the shaded peel. *Plant Sci.* 165, 819-827.
- Martin A, Frei B. 1997. Both intracellular and extracellular vitamin C inhibit atherogenic modification of LDL by human vascular endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17, 1583-1590.
- May JM, Mendiratta S, Hill KE, Burk RF. 1997. Reduction of dehydroascorbate to ascorbate by the selenoenzyme thioredoxin reductase. *J. Biol. Chem.* 272, 22607-22610.
- Mittova V, Volokita M, Guy M, Tal M. 2000. Activities of SOD and the ascorbate-glutathione cycle enzymes in subcellular

- compartments in leaves and roots of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii*. *Physiol Plant*. 110, 42-51.
- Noctor G, Foyer CH. 1998. Ascorbate and glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 249-279.
- Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee JH, Chen S, Corpe C, Dutta A, Dutta SK, Levine M. 2003. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J Am Coll Nutr.* 22, 18-35.
- R Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Roomi MW, House D, Tsao CS. 1998. Cytotoxic effect of substitution at 2-, 6-, and 2,6-positions in ascorbic acid on malignant cell line. *Cancer Biochem. Biophys.* 16, 295-300.
- Sayed SM, Roy PB, Acharya PT. 1975. Leucocyte ascorbic acid and wound infection. *J Indian Med Assoc.* 64, 120-123.
- Schreiber M, Trojan S. 1991. Ascorbic acid in the brain. *Physiol Res.* 40, 413-418.
- Smirnoff N, Wheeler GL. 2000. Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 35, 291-314.
- Stevens R, Page D, Gouble B, Garchery C, Zamir D, Causse M. 2008. Tomato fruit ascorbic acid content is linked with monodehydroascorbate reductase activity and tolerance to chilling stress. *Plant Cell Environ.* 31, 1086-1096.
- Thomas WR, Holt PG. 1978. Vitamin C and immunity: an assessment of the evidence. *Clin Exp Immunol.* 32, 370-379.
- Vásquez C, Orozco A, Rojas M, Sánchez M, Cervantes V. 1997. La reproducción de las plantas: semillas y meristemos, 1st ed. México.