

International Journal of **Biological and Natural Sciences**

EXPERIENCIAS DE ENSAYOS DE AUTODEFENSA EN PLANTAS CULTIVADAS

Francisco Simón Ricardo

Facultad Agropecuaria, Universidad Técnica
Luis Vargas Torres de Esmeraldas

Caicedo, J.

Facultad Agropecuaria, Universidad Técnica
Luis Vargas Torres de Esmeraldas

Andrea Romero

Facultad Agropecuaria, Universidad Técnica
Luis Vargas Torres de Esmeraldas

Mina P.

Facultad Agropecuaria, Universidad Técnica
Luis Vargas Torres de Esmeraldas

Méndez C.

Facultad Agropecuaria, Universidad Técnica
Luis Vargas Torres de Esmeraldas

All content in this magazine is licensed under a Creative Commons Attribution License. Attribution-Non-Commercial-Non-Derivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0).



Resumen: Un importante aporte de la Biotecnología e ingeniería genética y la Biología Molecular en el campo de la Fitosanidad, lo constituye sin lugar a dudas el tema de la inmunidad natural de las plantas mediante el papel de las fitoalexinas en los mecanismos de defensa. Los nuevos descubrimientos al respecto abren un campo inagotable del conocimiento que ha comenzado a gestarse a principios del presente siglo amparado en el desarrollo científico técnico alcanzado con las nuevas tecnologías en todos los ámbitos, permiten revolucionar entre otras vertientes la protección vegetal. Las plantas son invadidas por microorganismos patógenos que deterioran su crecimiento y reproducción; de ahí la importancia de esta revolución del conocimiento científico. Las plantas poseen un sistema de defensa que va desde barreras físicas hasta señales moleculares y sistémicas, similares a la inmunidad innata en animales. Este sistema actúa de dos formas fundamentales: (1) responde a moléculas comunes de muchas clases de microorganismos patógenos y no patógenos; (2) responde directamente a factores de virulencia de los patógenos o a sus efectores en el hospedante. Los aportes de experiencias prácticas propias en ensayos de inducción de autodefensa se han basado en la inoculación de simbiontes micorrizosfericos vesiculos-arbusculares (MVA) a plantas, en los casos de estudio en cultivos hortícolas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y pimiento (*Capsicum annuum*) cultivados en sistemas de organopónicos; así como plátano (*Musa* spp.) y frutales como papaya (*Carica papaya*) y piña (*Ananas comosus*) de forma convencional. Como simbiontes micorrizosférico se emplearon 3 especies del género *Glomus*: *G. intrarradices*, *G. fasciculatum* y *G. mosseae*. La valoración de cómo esta inoculación propició la estimulación de mecanismos de defensa se sustentó en el comportamiento comparativo

de las epifitias (curvas epifitológicas) de sus principales agentes fitopatógenos en particular de los hongos *Alternaria solani*, *Phytophthora infestans*, *P. parasitica*, *Colletotrichum capsici* y *Mycosphaerella fijiensis* y el complejo vírico que afecta a la papaya. En todos los casos *G. intrarradices* mostró el mejor comportamiento inductor de autoprotección de los cultivos, repercutiendo a su vez en los rendimientos de cada uno con más del 33% de incremento respecto a las plantas testigos no inoculadas. Palabras claves: Fitoalexinas, simbiontes micorrizosfericos, *Glomus*, *Alternaria*, *Phytophthora*.

INTRODUCCIÓN

Las plantas son invadidas por microorganismos patógenos que deterioran su crecimiento y reproducción; de ahí la importancia actual del conocimiento científico relacionado con la inmunidad natural de las plantas mediante el papel de las fitoalexinas en los mecanismos de defensa, un tema vetado hasta finales del siglo pasado. Al respecto se abre un campo inagotable del conocimiento que ha comenzado a gestarse a principios del presente siglo amparado en el desarrollo científico técnico alcanzado en biotecnología, ingeniería genética y biología molecular, que permiten revolucionar entre otras vertientes la protección vegetal, que en el argot socio-político y tecnológico se conoce como FITOSANIDAD 4.0.

Las investigaciones sobre respuesta defensiva de las plantas ante la presencia de patógenos son muy pobres y muchos aspectos no eran entendidos. Durante la década de los 90 del siglo pasado, muchas investigaciones se encaminaron a estudiar las interacciones moleculares y bioquímicas que tenían lugar en la interacción planta-patógeno. Las plantas a diferencia de los animales, son organismos sésiles que carecen de un sistema circulatorio, de células móviles

para la defensa y de un sistema inmune adaptativo; además, están sujetas al cambio de condiciones ambientales, incluyendo el constante ataque de agentes patógenos; sin embargo, poseen mecanismos de defensa que van desde barreras físicas (películas de cera en la superficie de sus órganos, paredes celulares rígidas, etc.), hasta potentes mecanismos moleculares de resistencia en cada célula y señales sistémicas provenientes del sitio de la infección que tienen marcadas similitudes con la inmunidad innata de los animales según hacen referencias Zipfel (2008) y Boller (2009).

Las plantas poseen un sistema de defensa que va desde barreras físicas hasta señales moleculares y sistémicas, similares a la inmunidad innata en animales. Este sistema actúa de dos formas fundamentales: (1) responde a moléculas comunes de muchas clases de microorganismos patógenos y no patógenos, y (2) responde directamente a factores de virulencia de los patógenos o a sus efectores en el hospedante. El conocimiento detallado del sistema inmune de las plantas abordado por Katia Ojito-Ramos y Orelvis Portal (2010), y Pérez-Ortega et. al., (2015), así como las relaciones moleculares evolutivas que se establecen entre los dos organismos, permiten una mejor comprensión de la interacción planta-patógeno. Ello redundará en una mejor manipulación genética de las plantas con el objetivo de lograr resistencia a patógenos con una mejora de las cosechas para la producción de alimentos.

En base al conocimiento que se está generando al respecto, se espera en un futuro contribuyan a una disminución considerable del uso de plaguicidas (Simón, 2019).

METODOLOGÍA

La investigación se llevó a cabo en un polígono de pruebas y ensayos anexo al laboratorio de Sanidad Vegetal en la

Estación Experimental Mutila perteneciente a la Facultad Agropecuaria de la Universidad Técnica Luis Vargas Torres de Esmeraldas. El clima donde se llevó a cabo la investigación mantuvo una temperatura que osciló entre los 23 a 29°C., según datos del Instituto Oceanográfico de la Armada (INOCAR), y la distribución de las precipitaciones a lo largo del año, mostraron un período de mayor intensidad en los meses de enero a julio; donde las precipitaciones medias mensuales máximas ocurrieron de febrero a marzo. Los experimentos en paralelo se condujeron utilizando un diseño bifactorial completamente aleatorizado con tres réplicas y dos repeticiones. El experimento de hortalizas en sistemas organopónico transcurrió como Factor A (Cultivos) con 2 variantes correspondientes con los cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*, L.), y pimiento (*Capsicum annuum*). El experimento con cultivos semi-perennes tuvo como Factor A, 3 variantes: plátano (*Musa* spp.), papaya (*Carica papaya*) y piña (*Ananas comosus*) en parcelas de campo. El (Factor B) en ambos con 4 variantes correspondientes a 3 especies de simbiontes micorrizosférico del género *Glomus*: *G. intraradices*, *G. fasciculatum* y *G. mosseae* y un testigo.

SIEMBRA DE PLÁNTULAS EN PARCELAS

Las plántulas de tomate y pimiento obtenidas del semillero se realizaron entre los 20 - 25 días tras verificar que todas tuvieran la tercera hoja verdadera. Para el cultivo de papaya la siembra se realizó a partir de plántulas en vivero que contaban con una altura promedio de 10cm; procediéndose en ambos casos a su trasplante en el polígono de pruebas de Sanidad Vegetal. El cultivo de plátano se fomentó a partir de cormos y la piña de hijuelos.

INOCULACIÓN DE PLÁNTULAS CON LOS SIMBIONTES MICORRIZOSFERICOS

La inoculación de los cultivos, se realizó por separado con las tres especies de HMVA ensayadas, directamente al suelo en la zona de goteo inmediatamente a la siembra, empleando biopreparados micorrízicos compuesto por suelo estéril con 10% de materia orgánica de humus de lombriz obtenidas *in situ* y raíces infestadas troceadas con un 60% de infección interna, además de esporas MVA de resistencia en distintos estadios de desarrollo (50 esporas + 10 esporocarpos/10 g de suelo), siguiendo el procedimiento de Simón (2010).

AISLAMIENTO Y COMPROBACIÓN DEL GRADO DE MICORRIZACIÓN DE LAS PLANTAS INOCULADAS

El aislamiento y comprobación del grado de micorrización de las plantas inoculadas se efectuó en el caso de las hortalizas (tomate y pimiento) a los 90 días de inoculadas, y de los cultivos semi-perennes a los 180 días, lo cual permitió determinar el grado de infección micorrízica alcanzado siguiendo el procedimiento de Camprubi et al. (1987). Para ello, se realizó el aislamiento en etapas sucesivas mediante una selección inicial de esporas, observaciones periódicas de las que se formaron en simbiosis con las raíces de la planta hospedera.

Las raíces se clarificaron y tiñeron para observar la presencia de infección micorrízica en el córtex radicular siguiendo el procedimiento de Phillips y Hayman (1970). Al final de este proceso, se procedió a las observaciones y mediciones microscópicas.

Se montaron las raíces en placas de vidrio con unas gotas de lactoglicerol, utilizado para la decoloración y conservación de las raíces; observándose, luego al microscopio óptico algunas de las principales estructuras de las

micorrizas, tales como vesículas, arbusculos, hifas a un lente objetivo de 10X, en algunos casos fue preciso lentes 40X para mejor observación de las estructuras.

Mediante observaciones al microscopio óptico de raíces clarificadas y teñidas según se describe con anterioridad, se evaluó la disposición, forma y tamaño arbusculo-vesicular utilizando las claves de Abbott y Robson (1979), que aparecen referidas en el compendio de Collins y Pflieger (1998), publicado por la sociedad agronómica de la Universidad de Minnesota, Estados Unidos de América, procediéndose tal como se detalla a continuación:

• Cálculo del porcentaje de colonización

Se tomó una lámina porta objetos lisa y se colocaron bajo microscopio óptico con ocular micrométrico o cámara de Neubauer colocándose paralelamente sobre el portaobjeto fragmentos de raíces cortados en trozos de 1 hasta 2cm. Las observaciones se realizaron con un lente objetivo de 4x y se contaron los campos colonizados. Se calculó el porcentaje de micorrización utilizando las siguientes fórmulas:

- GM (%): Grado de micorrización (%):
Área radicular micorrizada (%).
- LRC (%): Longitud de Raíz Colonizada:
segmentos colonizados/segmentos evaluados expresado en (%).
- Pi (%): Potencial de inóculo o Cobertura de cuerpos fructíferos:
Total de cuerpos fructíferos: esporas, esporocarpos, hifas/cm² de raíz.
- CI (%): Capacidad infectiva unitaria (%): dada por la relación GM/Pi.

Comportamiento de Epifitia del complejo biológico nocivo de fitopatógenos incidentes en los cultivos ensayados

El comportamiento de las respectivas epifitias: en tomate: *A.solani* y *P. infestans* en Pimiento: *C. capsici*; en plátano: *M. fijiensis*,

en papaya: el complejo vírico de la papaya y en la piña: *P. parasítica*, infestadas de forma natural, se evaluaron según los síntomas que las caracterizan a través de las respectivas escalas de daños descritas en catálogos con las descripciones de las manifestaciones de cada uno por cultivos (INISAV, 2011). El cálculo de los índices de infestación del complejo de fitopatógenos se realizó mediante la fórmula clásica de Townsend-Heuberger.

$$I.Inf (\%) = \sum (nxc)/N \times K \times 100$$

donde:

n= número de órganos subterráneos afectados

c= categoría del daños según la escala

N= tamaño de muestra

K= último grado de la escala.

RESULTADOS

Las muestras tomadas por cada variante inoculadas con HMVA, mostraron evidencias fehacientes de su colonización mediante los análisis efectuados para su detección y caracterización siguiendo los protocolos y procedimientos establecidos por Kormanik y McGraw (1987); Koske y Gemma (1989), revisados y simplificados por Castillo, (2009); Pitet et al., (2009) y Chávez et al., (2013).

Los cultivos de ciclo corto como hortalizas, mostraron menor grado de micorrización respecto a los cultivos semi-perennes (Tablas 1 y 2). Entre ambas hortalizas el tomate fue menos beneficiado respecto al pimiento (Tabla 1), debido precisamente a que su ciclo culmina antes de completar el período infectivo de los HMVA; la diferencia entre ambos se atribuye a la diferencia de las características botánicas; no obstante se consideran aceptables y satisfactorios al igual que en los restantes cultivos; por tanto, en todos los casos las condiciones fueron propicias para que se produzca la estimulación

y producción de elicitores tipo Fitoalexinas, destacándose la especie *G.intrarradis*, seguida por *G. fasciculatum* como más promisorias por grado de micorrización, con diferencias significativas entre las tres especies ensayadas, evidencias que se muestran en las tablas 1 y 2.

En correspondencia con lo antes expuestos, los cultivos hortícolas de tomate y pimiento mostraron un menor efecto auto protector respecto a los cultivos semiperennes tal como se muestra en las figuras 1 y 2.

Entre los fitopatógenos, los microorganismos *Phythora infestans* y *Colletotrichum capsici*, resultaron poco favorecidos en cuanto a su autocontrol por efecto de la micorrización según se evidencia en la figura 3.

El Comportamiento auto protector de los simbiontes micorrizosféricos HMVA ante el complejo biológico nocivo de fitopatógenos de los cultivos ensayados, acorde a la figura 4, resultó la mejor variante con diferencias significativa la especie *G. intrarradis*, seguida por *G. fasciculatum* y *G. mosseae* sin diferencias entre ambas, y todas con diferencias altamente significativas respecto al testigo.

Siguiendo el esquema propuesto por Zipfel, (2008) y Boller, T y He ShY (2009) acerca de las fases en que transcurren los mecanismos de auto protección inducidos por elicitores, la figura 5, con cierta aproximación, basado en la evolución y comportamiento de las epifitias, resume el comportamiento de las diferentes fases auto protectora de los simbiontes micorrizosféricos ante el complejo biológico nocivo de fitopatógenos de los cultivos ensayados, corroborando la existencia de 6 fases esenciales a partir de la inoculación artificial del fitopatógeno.

Estas fases a saber: (1) inicio de la infección, denominada iniciación de la infección; (2) fase exponencial de la infección, en la cual las plantas no están del todo preparadas para enfrentar la infección;

CULTIVOS	<i>G. intrarradis</i>		<i>G. fasciculatum</i>		<i>G. mosseae</i>	
	GM(%)	Ci=GM/Pi	GM(%)	Ci=GM/Pi	GM(%)	Ci=GM/Pi
Tomate	27 ^c	0.54 ^b	27 ^b	0.54 ^c	17 ^b	0.34 ^b
Pimiento	39 ^b	0.78 ^b	31 ^b	0.62 ^b	19 ^b	0.38 ^b

Tabla 1. Resultados obtenidos de micorrización de los cultivos hortícolas a los 90 días de inoculados con los tres endófitos MVA seleccionados a un 5% de significación.

CULTIVOS	<i>G. intrarradis</i>		<i>G. fasciculatum</i>		<i>G. mosseae</i>	
	GM(%)	Ci=GM/Pi	GM(%)	Ci=GM/Pi	GM(%)	Ci=GM/Pi
Plátano	47 ^a	0.94 ^a	41 ^a	0.82 ^a	41 ^a	0.82 ^a
Papaya	44 ^a	0.88 ^{ab}	44 ^a	0.88 ^a	39 ^a	0.78 ^a
Piña	38 ^b	0.76 ^b	41 ^a	0.82 ^a	21 ^b	0.42 ^b

Tabla 2. Resultados obtenidos de micorrización de los cultivos semi-perennes a los 90 días de inoculados con los tres endófitos MVA seleccionados a un 5% de significación.

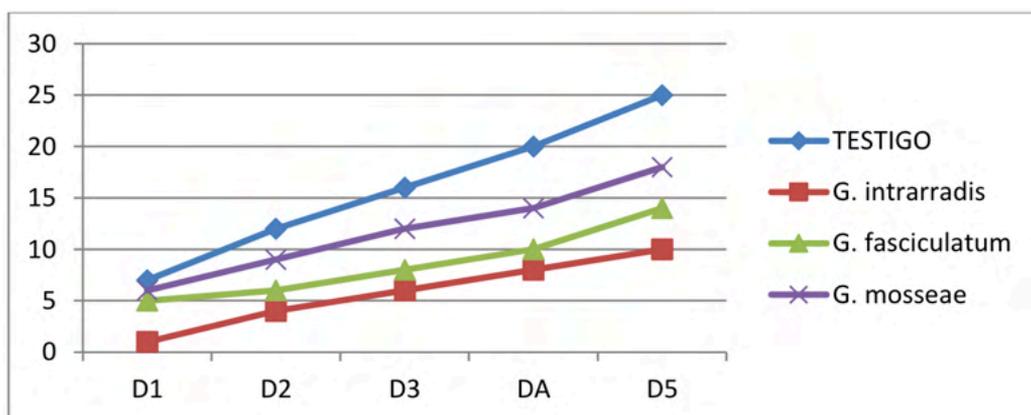


Fig. 1^a. Cultivo de tomate infestado con *Alternaria solani*.

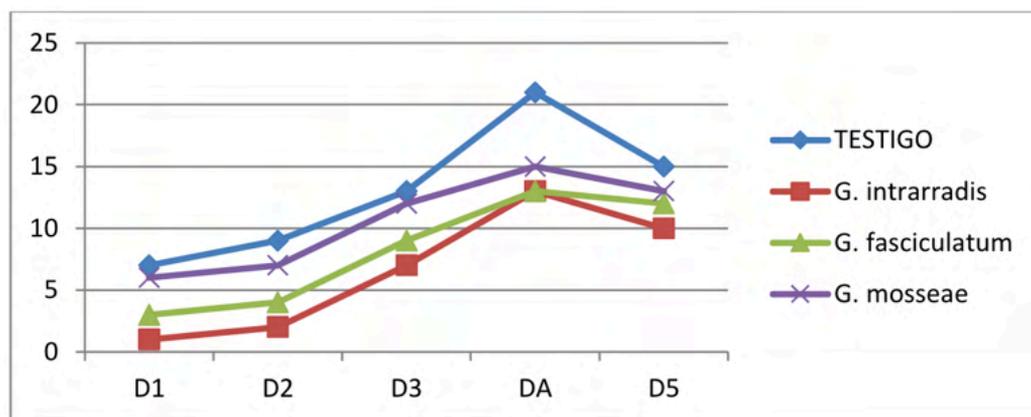


Fig. 1^b. Cultivo de tomate afectado con *Phytoththora infestans*.

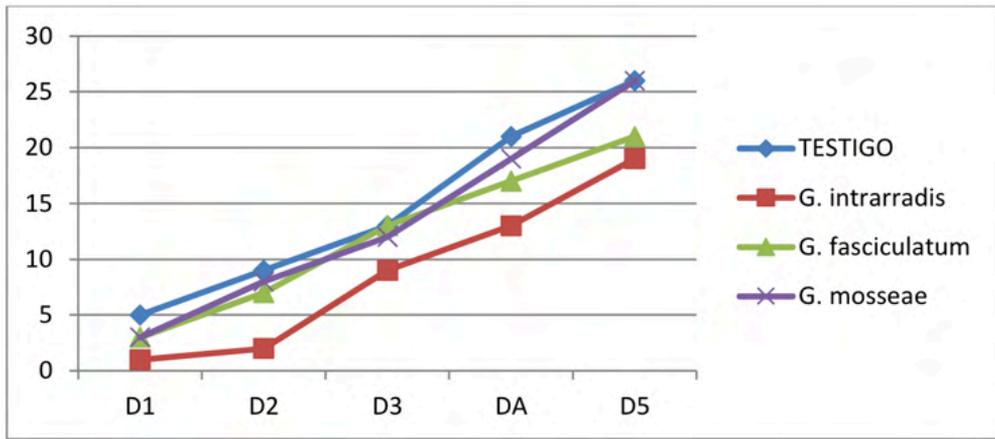


Fig. 1^c. Cultivo de Pimiento afectado por *Colletotrichum capsici*.

Figuras 1^{abc}. Cultivos hortícolas afectados por fitopatógenos y respuesta auto protectora de simbiontes micorrizosfericos.

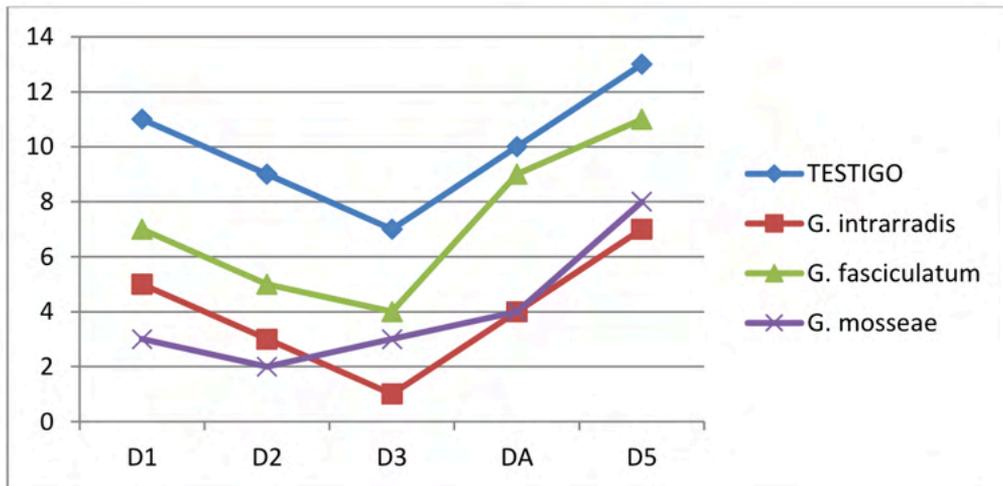


Fig. 2^a Cultivo de plátano infestado por *Mycosphaerella fijiensis*.

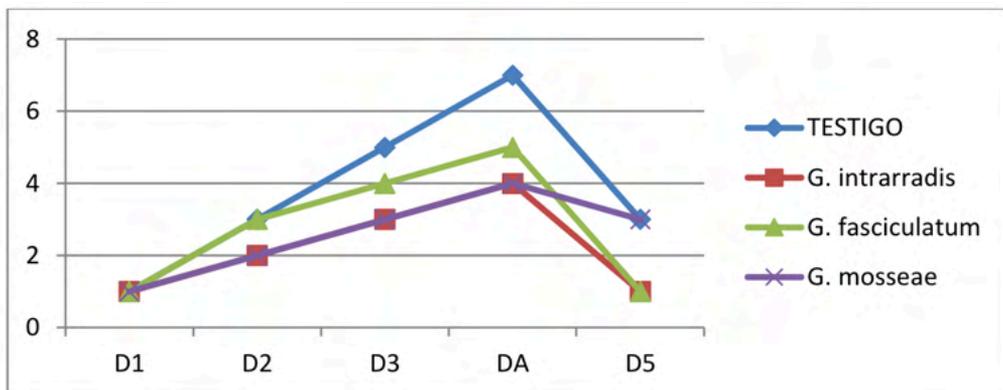


Fig. 2b Cultivo de papaya infestado por su complejo vírico.

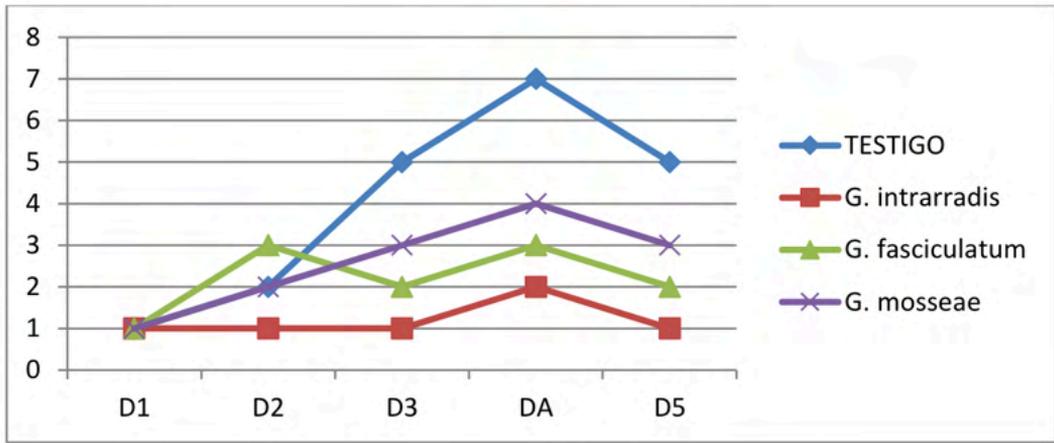


Fig. 2c. Cultivo de piña infestado por *Phytothora parasitica*.

Figuras 2abc. Cultivos de plátano, papaya y piña afectados por fitopatógenos y respuesta auto protectora de simbiontes micorrizosféricos.

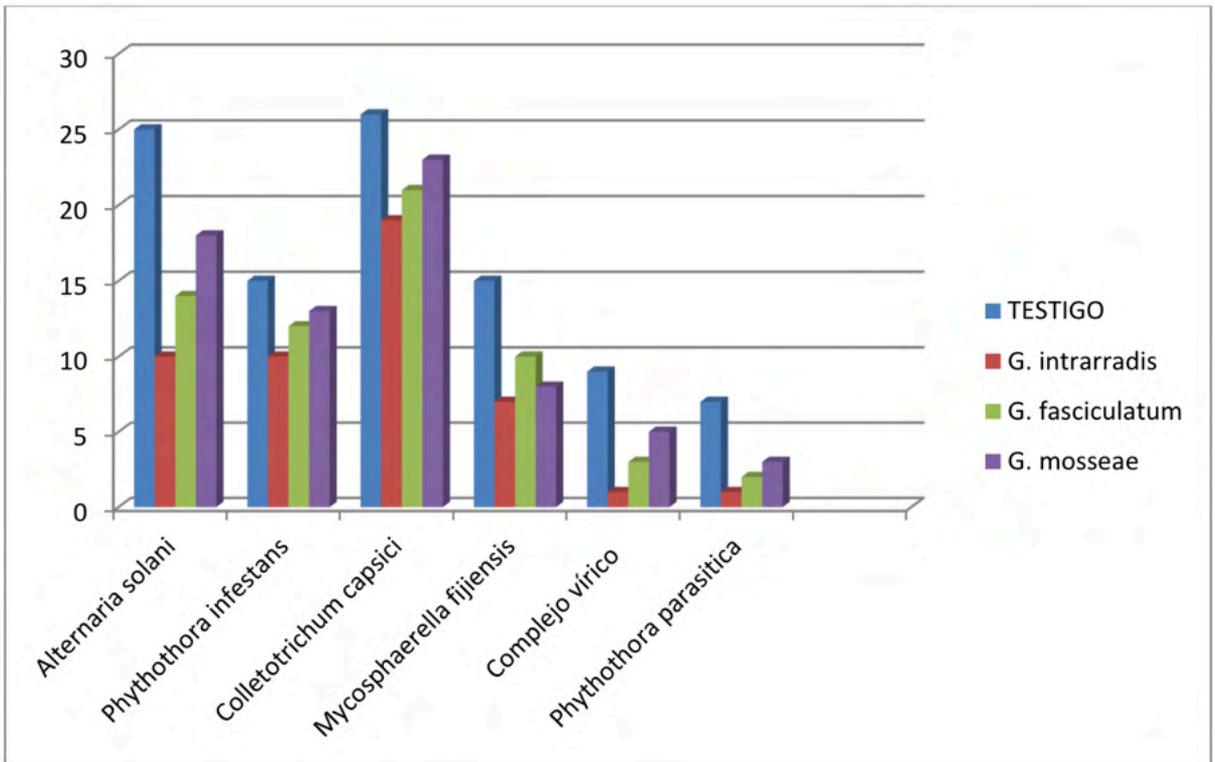


Figura 3. Comportamiento de fitopatógenos ante respuesta autoprotectora de simbiontes micorrizosféricos.

COMPLEJO DE FITOPATOGENOS

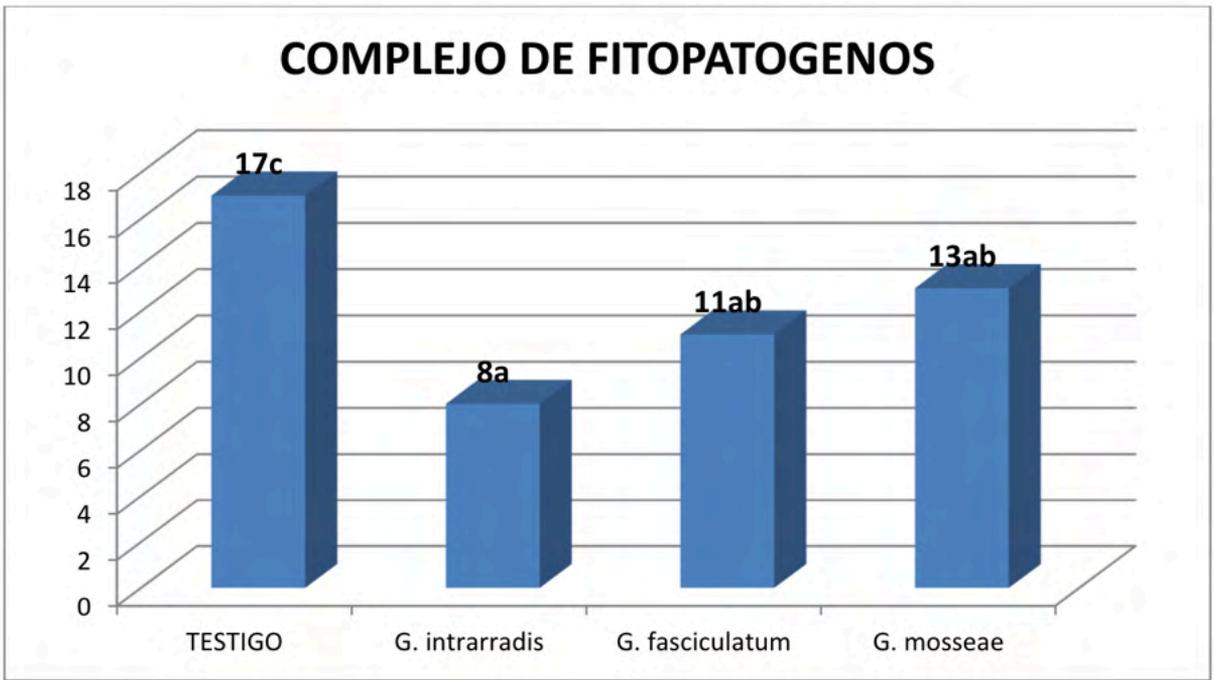


Figura 4. Comportamiento de simbioses micorrizosfericas ante el complejo biológico nocivo de fitopatógenos de los cultivos ensayados.

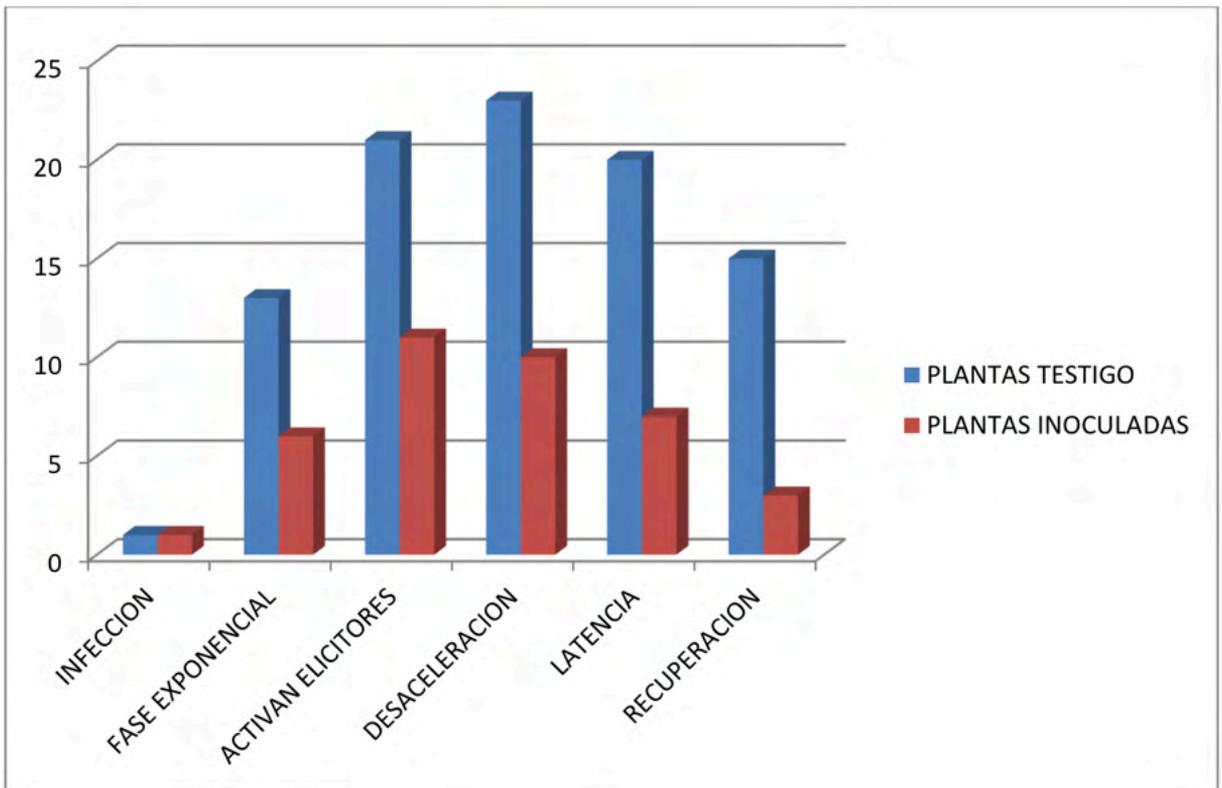


Figura 5. Diferentes fases inductoras de auto protección de simbioses micorrizosfericas ante el complejo biológico nocivo de fitopatógenos en los cultivos ensayados.

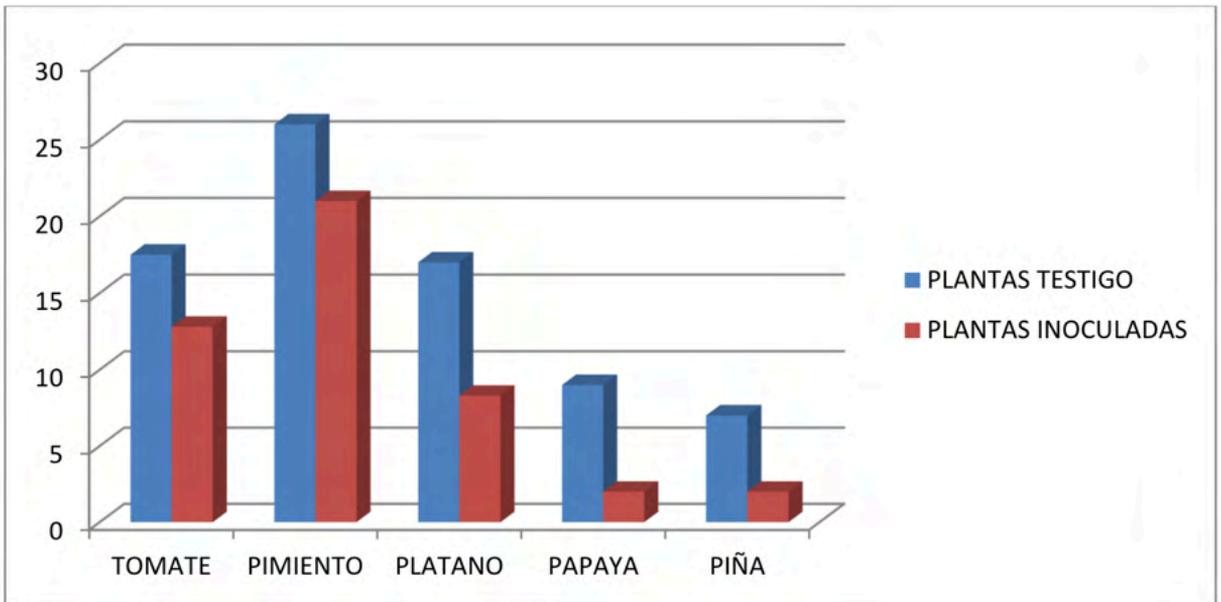


Figura 6. Índice de infestación de plantas de cultivos inoculados con MVA respecto a testigos.

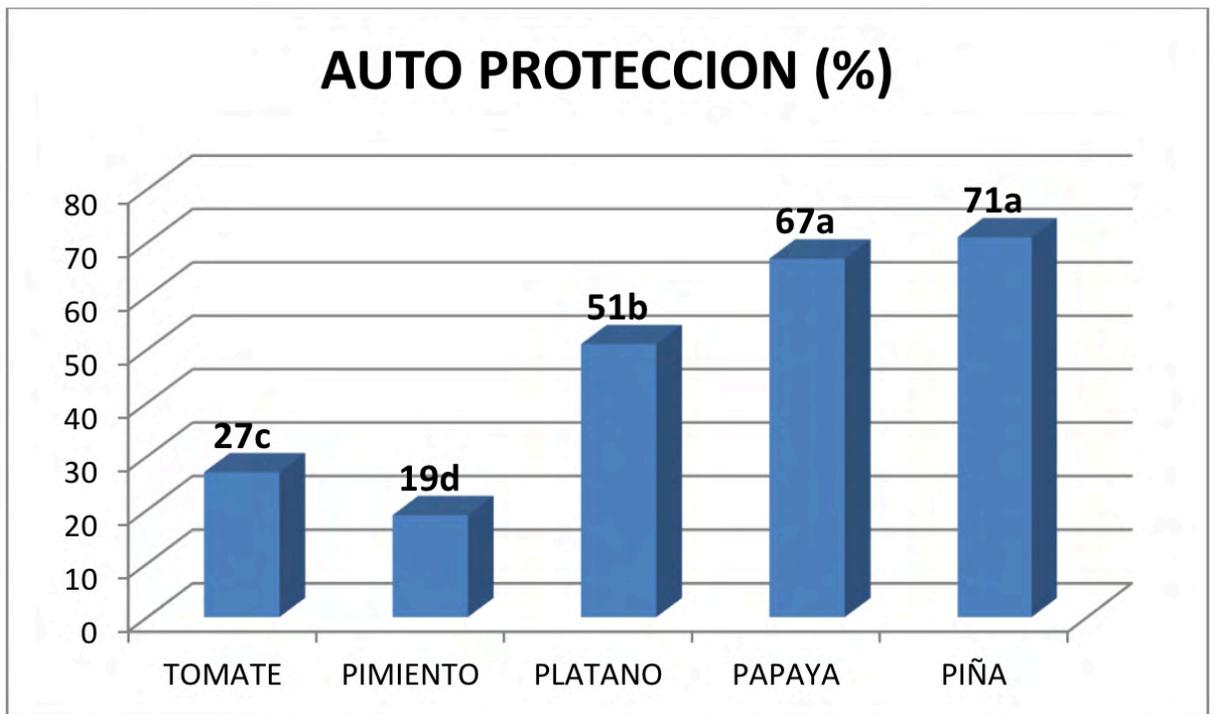


Figura 7. Auto protección de cultivos inoculados con simbiontes micorrizosféricos del género *Glomus*.

(3) Activación y producción de elicitores; es la fase más importante que puede ser medible y controlable mediante determinaciones analíticas de ciertas moléculas reconocibles conocidas por Fitoalexinas, existiendo actualmente plantas como modelos biológicos dentro de las familias de las solanáceas, como tomate y tabaco y las leguminosas que han permitido realizar estudios cinéticos de biología molecular (Jones y Dangl, 2006) y He et al., (2007), de la producción de fitoalexinas.

Las restantes fases: (4) desaceleración del proceso infectivo; (5) latencia y (6) recuperación, transcurre mucho más rápido según los autores antes mencionados, así que la fase limitante (3) es precisamente la relacionada con la activación y producción de elicitores; por ello, los estudios de actualidad se centran en cómo activar esta fase para hacerla más corta y más pegada al inicio de la infección.

En el presente ensayo, en sentido general según se aprecia en la figura 6, los índices de infestación de sus correspondientes fitopatógenos registrados en los cultivos inoculados con HMVA respecto a testigos, muestran cierto grado de autoprotección, con resultados incluso sorprendentes como los casos de los tres cultivos semiperennes, que rebasan el 50%, incluso valores cercanos al 70% de autoprotección tal como se muestra en la figura 7.

CONSIDERACIONES FINALES

A pesar que hay evidencias fehacientes marcadas sobre respuesta defensiva de las plantas ante la presencia de patógenos, las investigaciones apenas comienzan, en el presente aún son escasas y muchos aspectos no están totalmente claros ni bien entendidos. A partir de la década de los 90 del siglo pasado, muchas investigaciones se encaminaron a estudiar las interacciones

moleculares y bioquímicas que tienen lugar en la interacción planta-patógeno, pero queda un largo trecho por investigar cómo acelerar este proceso de activación de elicitores que eviten que las respuestas autoinmunes sean demasiado tardes cuando ya el fitopatógeno ha deteriorado en gran magnitud a las plantas cultivadas, máxime por tratarse de organismos sésiles que carecen de un sistema inmune adaptativo sujetos al cambio de condiciones ambientales, incluyendo el constante ataque de agentes patógenos.

En base al conocimiento que se está generando al respecto, se espera en un futuro contribuyan a una disminución considerable del uso de plaguicidas y alcanzar un mayor protagonismo en cuanto a la autoprotección de los cultivos que minimicen la aplicación de medios de combate de las plagas y enfermedades en las plantas, incluso se alcancen mayores rendimientos en la producción de alimentos.

Como se hizo referencia, las investigaciones al respecto apenas comienzan, sirvan estas experiencias como un modesto aporte a la Fitosanidad 4.0 que se gesta.

REFERENCIAS

- Abbott, L. & A. Robson (1979). A quantitative study of the spores and anatomy of mycorrhizas formed by a species of *Glomus*, with reference to its taxonomy. *Aust. J. Bot.*, 27: 363-375
- Zipfel, C (2008) Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Current Opinion in Immunology* 20: 10-16
- Boller, T y He ShY (2009) Effectors in microbial pathogens pattern recognition receptors in plants and innate immunity in plants: An arms race between. *Science* 324: 742-44
- Camprubi, A.; C. Calvet; V. Estaun y J. Pera (1987). Aislamiento de un hongo formador de micorrizas vesículo-arbusculares y ensayo de su efectividad en Crisantemo y Fresa. *Invest. Agr.: Prod. & Prot. Veg.* 2(3): 281-294.
- Castillo M. L. (2009). Caracterización morfológica de micorrizas arbusculares asociadas en raíces de tomate de árbol silvestre (*Solanum cajaniensis*) y cultivado (*Solanum betacea*) en dos sectores de la provincia de Loja. Loja, Ecuador: Universidad Técnica Particular de Loja.
- Chávez A.T., Lua J., Salmerón I.A., García P.A., Bárcenas A.E. & Olalde V. (2013). A modified staining technique for the anatomical observation of mycorrhizal roots of woody trees. *African Journal of Microbiology Research.* 7(28): 3589-3596.
- Collins, Nancy y F. L. Pflieger (1998). Vesicular-Arbuscular Mycorrhizae and Cultural Stresses. *Minn. Am. Soc. Agr. Univ. Minnesota*, p. 71-99. (Special Publication; 54).
- He, P, Shan L y Sheen J (2007). Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in plant-microbe interactions. *Cellular Microbiology* 9: 1385-96
- INISAV (2011). Compendio metodológico de registro señalización y pronóstico de plagas y enfermedades Volumen II. Editorial Ciencia y Técnica MINAG. 372 p.
- Jones J.D. y Dangl J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444: 323-329.
- Katia Ojito-Ramos y Orelvis Portal (2010). Introducción al sistema inmune en plantas. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias Agropecuarias e Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Cuba. *Biotecnología Vegetal Vol. 10, No. 1: 3 - 19*, ISSN 1609-1841 (Versión impresa) ISSN 2074-8647 (Versión digital)
- Kormanik P. y McGraw A. (1987). Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhizae in plant roots. In: Schenck NC (ed) *Methods and principles of mycorrhizal research.* American Phytopathological Society. 37-45.
- Koske R. E. y Gemma J. N. (1989). A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycological Research.* 92: 486-489.
- Pérez-Ortega E., Blanca M. de la Noval, Martínez B., Torres W., Aida Medina, Annia Hernández, y Ondina León (2015). Inducción de mecanismos de defensa en plantas de tomate (*Solanum lycopersicon* L.) micorrizadas frente al ataque de *Oidiopsis taurica* (Lev) Salm. *Cultivos Tropicales* Vol. 36 No. 1, pp. 98-106. ISSN impreso 0258-5936 ISSN digital 1819-4087
- Phillips J. M. y D. S. Hayman (1970). Improved procedures for cleaning roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55:158-161.
- Pitet M., Camprubí A., Calvet C. y Estaun V. (2009). A modified staining technique for arbuscular mycorrhiza compatible with molecular probes. *Mycorrhiza.* 19(2): 125-131.
- Simón, F.A. (2010). *Agrobiotecnología y Fitosanidad. COLECCIÓN FITOSANIDAD.* Editora Ciencia y Técnica Universidad de Oriente, Cuba ISBN: 978-959-207-389-0 Registro de Obra Protegida CENDA 551-2010 del 23 de febrero del 2010, 213p.
- Simón, F.A. (2019). *Agricultura, Biotecnología y Competitividad.* Editorial Académica Española 348p. is an imprint of: SIA OmniScriptum Publishings Ed. Morebooks ISBN: 978-613-9-43302-5