

INCIDÊNCIA FÚNGICA EM GLOMÉRULOS E SÂMARAS DE *Casuarina equisetifolia* (CASUARINACEAE)

Tales Poletto<sup>1</sup>  
Marlove F B Muniz<sup>1</sup>  
Vinícius S Fantinel<sup>1</sup>  
Renata F Favaretto<sup>1</sup>  
Igor Poletto<sup>1</sup>

RESUMO

A casuarina (*Casuarina equisetifolia*) é uma angiosperma que pertence à família Casuarinaceae e é largamente utilizada na fixação de dunas na orla marítima, como quebra-ventos em pomares e na recuperação de áreas degradadas. Entretanto, tem apresentado problemas com mortalidade de plântulas em viveiro. As sâmaras podem carregar microrganismos na sua superfície ou internamente, constituindo-se um dos principais meios de disseminação de patógenos de plantas. O presente trabalho teve por objetivo identificar e avaliar a incidência de fungos associados aos glomérulos e sâmaras de casuarina. Para isso, foram coletados glomérulos e sâmaras de árvores matrizes em Santa Maria-RS. No laboratório, os glomérulos passaram por um processo de desinfestação e foram submetidos ao teste de sanidade em papel filtro. As sâmaras também foram submetidas ao mesmo teste, porém comparando-as com e sem assepsia. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado e cada tratamento foi composto de quatro repetições de 25 (glomérulo/sâmara). *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Alternaria* spp., *Pestalotiopsis* spp., *Phoma* spp. e *Colletotrichum* spp. foram encontrados tanto em glomérulos como em sâmaras, indicando, possivelmente, a transmissão de um para outro. Esses fungos são conhecidos mundialmente por causarem doenças em sementes, plântulas e mudas em viveiro de muitas espécies florestais.

**Palavras-chave:** Casuarina; Patologia de Sementes; Sementes Florestais

ABSTRACT

**Fungic incidence in glomeruli and samaras of *Casuarina equisetifolia* (Casuarinaceae).** The casuarina (*Casuarina equisetifolia*) is an angiosperm belonging to the family Casuarinaceae and is widely used in the establishment of dunes on the seafont, as windbreaks in orchards and in the recovery of degraded areas. However, it has presented problems with seedling mortality in nursery. Samaras can carry microorganisms on their surface or internally, constituting one of the main means of dissemination of plant pathogens. The objective of this study was to identify and evaluate the incidence of fungi associated with glomeruli and casuarina samaras. For this, we collected glomeruli and chambers from parent trees in Santa Maria-RS. In the laboratory, the glomeruli underwent a disinfestation process and were submitted to the filter paper sanity test. The samaras were also submitted to the same test, but comparing with and without asepsis. The experimental design was completely randomized and each treatment consisted of four replicates of 25 (glomeruli/samaras). *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Alternaria* spp., *Pestalotiopsis* spp., *Phoma* spp. and *Colletotrichum* spp. were found in both glomeruli and samaras, possibly indicating transmission from one to another. These fungi are known worldwide for causing diseases in seeds, seedlings and seedlings in

<sup>1</sup> Depto. de Defesa Fitossanitária, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail para correspondência: [tecnicotales@hotmail.com](mailto:tecnicotales@hotmail.com)

nurseries of many forest species.

**Keywords:** Casuarina; Seed Pathology; Forest Species

## INTRODUÇÃO

A casuarina (*Casuarina equisetifolia* L.) é uma espécie nativa da Oceania, ilhas do Pacífico e Sudeste Asiático, pertencente à família Casuarinaceae. É uma árvore de grande porte, podendo crescer até 20 metros de altura. Sua copa tem formato piramidal de cor verde-acinzentada e apresenta ciclo vegetativo perenifólio (Wang *et al.*, 2013; Uy e Garcia, 2015).

A casuarina é uma espécie monóica, as flores estaminadas formam uma inflorescência conhecida como espiga e as pistiladas classificam-se como glomérulos. Os frutos (sâmaras) são envolvidos por brácteas lenhosas que se assemelham a uma cápsula (Souza e Lorenzi, 2008).

Devido à versatilidade de adaptação, a espécie tem sido amplamente plantada fora de sua área de ocorrência natural, principalmente em países subtropicais e tropicais (Ayin *et al.*, 2015). É muito utilizada em quebra-ventos, ornamentação de ruas, conservação de solos e fixação de dunas, visto que apresenta tolerância a ambientes salinos. Apresenta madeira com alto valor calorífico, sendo utilizada principalmente como combustível. A madeira pode também ser empregada em interiores de casas e mobiliário decorativo (Ferreira, 2004; Ayin *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2017). Na China, a área plantada de *Casuarina equisetifolia* chegou a 300 mil hectares em 2013, objetivando o sequestro de carbono atmosférico (CO<sub>2</sub>) (Wang *et al.*, 2013). Suas raízes abrigam bactérias fixadoras de nitrogênio e seu sistema radicular profundo permite que seja eficientemente utilizada para melhorar as características físicas do solo (Zhang *et al.*, 2010).

Sua propagação é realizada via sementes, as quais são dispostas em sementeiras até serem repicadas para embalagens individuais. Por se tratar de um ambiente geralmente quente e úmido, o viveiro proporciona condições favoráveis ao desenvolvimento de doenças, principalmente as causadas por fungos. A produção de mudas saudáveis e bem desenvolvidas é um fator de extrema importância para seu desenvolvimento depois do transplante, sendo que os viveiros de produção de mudas estão permanentemente sujeitos a problemas que afetam de forma negativa a produtividade e a qualidade das mudas produzidas (Navas *et al.*, 2016).

Os fungos, como qualquer grupo de patógenos, são disseminados por vários vetores, como vento, água, insetos e animais, mas nenhum vetor de disseminação é tão eficiente quanto as sementes, uma vez que o patógeno veiculado por elas tem maior chance de provocar doenças nas plantas desenvolvidas e de se espalhar para outras plantas saudáveis, iniciando, assim, uma epidemia (Dhingra, 2005).

Sem dúvida, a presença de patógenos em sementes é apontada como ameaça séria à qualidade das mesmas, causando sua podridão, decréscimo do poder germinativo, menor desenvolvimento de plântulas, principalmente, nos primeiros estágios, necrose do sistema radicular, lesões no colo das mudas, tombamento, murcha e morte de plântulas (Carneiro, 1986). Assim, a detecção prévia desses patógenos, antes da semeadura das sementes, possibilita a adoção de tratamentos que os elimine, além de auxiliar na germinação e também evitar a sua introdução em áreas isentas.

Nesse sentido, muitos estudos foram conduzidos buscando novas técnicas para o controle de doenças em sementes de espécies florestais. A assepsia em sementes é uma delas, pois, além de agir direta-

mente na fonte de inóculo do patógeno, é de fácil aplicação, tem boa eficiência no controle de doenças e apresenta baixo custo (Menten, 1995). Segundo Pinheiro *et al.* (2016), a assepsia de sementes de *Cedrela fissilis*, usando NaClO a 2% por 1 min, promoveu a germinação e reduziu a incidência de *Fusarium* spp. Hennipman *et al.* (2017) relataram que a desinfestação das sementes de *Araucaria angustifolia* com NaClO na concentração de 0,5 a 3% garantiu a qualidade sanitária delas durante o armazenamento por 12 meses e favoreceu positivamente a qualidade fisiológica das sementes armazenadas por período superior a quatro meses. Já a assepsia de sementes com álcool 70% durante 2 min e, posteriormente, NaClO a 1% por 5 min não foi eficiente para eliminação dos fungos potencialmente patogênicos associados às sementes de *Carya illinoensis* (Poletto *et al.*, 2014).

Poucos são os estudos acerca da associação de fungos em estruturas reprodutivas de casuarina no Brasil. Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar e avaliar a incidência de fungos associados aos glomérulos e sâmaras de casuarina.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta de Glomérulos e Sâmaras

A coleta das amostras (sâmaras e glomérulos maduros) foi realizada em 20 árvores matrizes de, aproximadamente, 10 anos de idade no município de Santa Maria - RS. As amostras foram coletadas em galhos localizados, aproximadamente, a 2m do chão. O material coletado foi embalado em sacos de papel e levado ao Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) para análise. Os glomérulos coletados permaneceram em temperatura ambiente por sete dias para secagem e liberação dos frutos secos do tipo sâmara (Figura 1).



**Figura 1.** Árvores matrizes, ramo com infrutescências femininas (glomérulos), infrutescência (glomérulo) após liberar os frutos do tipo sâmara de *Casuarina equisetifolia*.

### Teste de Sanidade para as Infrutescências Femininas (Glomérulos)

Foram utilizados 100 glomérulos divididos em quatro repetições de 25. Após imersão em uma solução de álcool e água destilada e esterilizada na proporção de 70:30 (álcool com concentração de 98%),

durante 30 segundos e, em seguida, em uma solução de hipoclorito de sódio (concentração de 1%) e água destilada por 30 segundos, foram lavados em água destilada esterilizada. Posteriormente, foram colocados em caixas gerbox sobre duas folhas de papel-filtro, umedecidas com água destilada e esterilizada. A incubação ocorreu a 25 °C ( $\pm 2$  °C), sob fotoperíodo de 12h por 7 dias.

#### Teste de Sanidade para os Frutos (Sâmaras)

Foram utilizadas 100 sâmaras sem assepsia e 100 sâmaras com assepsia, como descrito anteriormente, para os glomérulos, dispostas em caixas gerbox previamente desinfetadas, sob duas folhas de papel-filtro esterilizadas. A incubação ocorreu a 25 °C ( $\pm 2$  °C), sob fotoperíodo de 12h por 7 dias. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições de 25 sementes cada tratamento. Os dados foram submetidos à transformação por  $\sqrt{x+100}$  para normalização e, em seguida, submetidos à análise da variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Para as análises, utilizou-se o software estatístico SISVAR 5.3.

#### Identificação dos Fungos

Após o período de incubação, os glomérulos e as sâmaras foram analisados em microscópio estereoscópio, e foram confeccionadas lâminas para observação das estruturas fúngicas em microscópio ótico. Com base na bibliografia especializada (Barnett e Hunter, 1998), foram identificados os gêneros fúngicos presentes nos glomérulos e nas sâmaras com e sem assepsia e as suas respectivas incidências.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação sanitária dos glomérulos, foram encontrados diversos gêneros fúngicos, dentre eles, alguns potencialmente patogênicos: *Fusarium* spp., *Colletotrichum* spp., *Phoma* spp., *Diplodia* spp., *Curvularia* spp., *Alternaria* spp., *Pestalotiopsis* spp. e *Rhizoctonia* spp., além de saprofitos *Nigrospora* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Rhizopus* spp. e *Trichothecium* spp. (Tabela 1).

Os fungos associados às sâmaras, em ambos os tratamentos (com e sem assepsia), foram *Rhizoctonia* spp., *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Pestalotiopsis* spp., *Aspergillus* spp., *Phoma* spp. e *Colletotrichum* spp., sendo que não houve redução significativa da incidência com a realização da assepsia, exceto para *Rhizoctonia* spp. (redução para 24,0%) e *Aspergillus* spp. (redução para 2,0%). A assepsia foi responsável pela eliminação do fungo *Penicillium* spp., apesar da incidência ser de apenas 1,0 % (Tabela 2).

Tabela 1. Incidência (%) de fungos em glomérulos de *Casuarina equisetifolia*.

Fungos	Incidência (%)	CV(%)
<i>Fusarium</i> spp.	52,0	18,4
<i>Nigrospora</i> spp.	52,0	14,8
<i>Pestalotiopsis</i> spp.	48,0	12,9
<i>Rhizoctonia</i> spp.	44,0	16,0
<i>Alternaria</i> spp.	32,0	21,3
<i>Aspergillus</i> spp.	24,0	15,1
<i>Rhizopus</i> spp.	20,0	16,4
<i>Colletotrichum</i> spp.	12,0	20,5
<i>Phoma</i> spp.	4,0	22,4
<i>Penicillium</i> spp.	4,0	14,5
<i>Curvularia</i> spp.	4,0	16,4
<i>Diplodia</i> spp.	4,0	19,7
<i>Trichothecium</i> spp.	12,0	20,1

Verificou-se que alguns fungos ocorreram tanto em glomérulos como em sâmaras, mesmo após serem submetidos ao tratamento de assepsia, como *Colletotrichum* spp. e *Fusarium* spp. (Figuras 2A e B), *Rhizoctonia* spp., *Alternaria* spp., *Pestalotiopsis* spp. e *Phoma* spp. Possivelmente, esses fungos foram transmitidos dos glomérulos para as sâmaras. Fungos como *Fusarium* spp. e *Rhizoctonia* spp. são patógenos que causam severos danos em viveiros. São relatados comumente associados à podridão de sementes e de raízes e damping-off de pré e pós emergência, como observado por Su e Fu (2013), com *Fusarium oxysporum* causando podridão-de-raízes em *Pulsatilla coreana*; por Pérez-Hernández *et al.* (2014), com *F. oxysporum* causando podridão-de-raízes e damping-off em *Capsicum annuum*; e por Li *et al.* (2014), com *Rhizoctonia* AG-A causando damping-off em *Setaria italica*.

Tabela 2. Incidência de fungos (%) em sâmaras de *Casuarina equisetifolia* com e sem assepsia. \*Médias não seguidas de mesma letra diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Fungos	Sem assepsia	Com Assepsia	CV(%)
<i>Rhizoctonia</i> spp.	40,0 a*	24,0 b	28,8
<i>Fusarium</i> spp.	34,0 a	33,0 a	22,7
<i>Alternaria</i> spp.	9,0 a	6,0 a	27,7
<i>Pestalotiopsis</i> spp.	15,0 a	8,0 a	24,3
<i>Aspergillus</i> spp.	7,0 a	2,0 b	22,1
<i>Phoma</i> spp.	5,0 a	5,0 a	20,0
<i>Colletotrichum</i> spp.	5,0 a	2,0 a	25,3
<i>Penicillium</i> spp.	1,0 a	0,0 a	21,1

O fungo *Fusarium lacertarum* foi relatado como o agente causador de damping-off em plântulas de casuarina em viveiros brasileiros (Poletto *et al.*, 2015), evidenciando que já está contaminando os glomérulos e as sâmaras antes mesmo da colheita e causando danos quando elas são semeadas em viveiro. Os patógenos *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia* spp. também foram relatados como agentes

causadores de podridão-de-raízes em viveiros de erva-mate (*Ilex paraguariensis*). Poletto *et al.* (2015) observaram que 80% das flores de erva-mate apresentaram incidência de *Fusarium* spp. e 15% de *Rhizoctonia* spp., e até 90% dos frutos apresentavam incidência de *Fusarium* spp. e 10% por *Rhizoctonia* spp.. Os autores evidenciam que as flores e os frutos podem ser o mecanismo de infecção dos patógenos no patossistema (erva-mate/podridão-de-raízes) e ressaltam a importância de conhecer os fungos associados aos frutos e flores, pois podem ser transmitidos para as sementes ocasionando problemas no armazenamento e na germinação.

*Colletotrichum* é um importante patógeno de flores e frutos em muitas espécies de plantas. Por exemplo, a podridão-floral-dos-citros (PFC), também conhecida por estrelinha, causada por *Colletotrichum acutatum* e *C. Gloeosporioides*, é uma das principais doenças dos citros e afeta flores e frutos recém formados. As flores atacadas pelo fungo apresentam lesões necróticas e caem (Silveira *et al.*, 2016). Em cultivos de *Acca selowiana*, *Colletotrichum siamense* está associado a frutos causando antracnose, com perdas de até 75% na produção, em decorrência da queda prematura dos frutos (Fantinel *et al.*, 2017). Não obstante, *Colletotrichum* spp. está presente também nas sementes dessa espécie (Fantinel *et al.*, 2015).

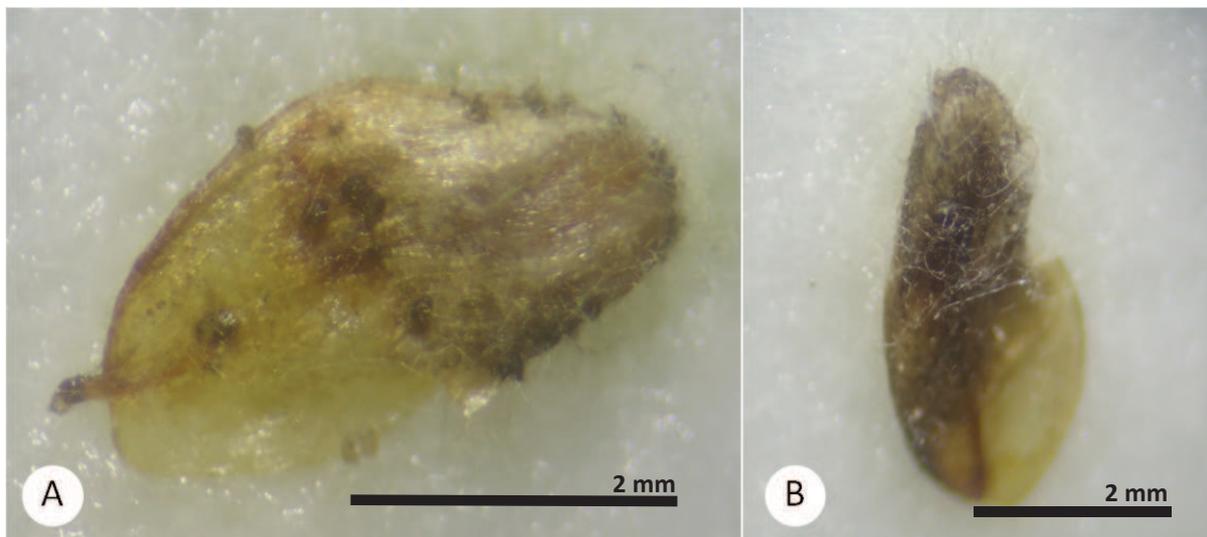


Figura 2 A. sâmara de *Casuarina equisetifolia* com presença de *Colletotrichum* spp. B. sâmara de *Casuarina equisetifolia* com presença de *Fusarium* spp.

Dhingra, Muchovej e Cruz Filho (1980) e Machado (1988) relatam que a contaminação de sementes por espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* ocorre após a colheita, enquanto a infecção por *Fusarium* spp. e *Sphaeropsis* spp. ocorre durante a formação ou a maturação do fruto. Assim, segundo os mesmos autores, a infestação por muitos fungos pode ser diminuída mediante cuidados na colheita e no manuseio das sementes.

A fonte de inóculo para a infecção das sementes pode ser originada de uma fonte externa, atingindo flores, frutos e sementes. São diversas as formas de infecção das sementes, entre elas: estigma, nectário, pedúnculo da flor ou do fruto, aberturas no fruto. Além disso, a cavidade de alguns tipos de frutos pode atuar como câmara úmida para desenvolvimento de fungos (Menten e Bueno, 1987).

Segundo Agarwal e Sinclair (1996), e Dhingra (2005), a infecção de uma semente por um patógeno pode ocorrer por diversas rotas como a infecção sistêmica, que ocorre quando o patógeno cresce sistematicamente pelo sistema vascular, pela flor, pelo pedicelo, pedúnculo ou funículo. Na infecção via estigmas de flores, o patógeno chega até a semente através da colonização sistêmica de estigmas, seguindo o caminho do tubo polínico; a infecção local via pericarpo e tegumento, sendo esse o mecanismo mais comum de infecção por patógenos necrotróficos. Em geral, a contaminação superficial pode ocorrer durante a colheita, ou em operações pós-colheita, mas isso pode ocorrer ainda na planta, quando o patógeno, na cavidade do fruto, começa a esporular, deixando os esporos na superfície da semente (Dhingra, 2005).

A detecção de fungos patogênicos associados às sâmaras é um aspecto importante no manejo de doenças. Essa detecção permite a aplicação adequada de técnicas de controle ou modificações nas práticas de manejo para evitar problemas futuros. Para obtenção de mudas de qualidade fisiológica e sanitária, é necessário conhecer a sanidade e a qualidade de sâmaras ou de sementes utilizadas, pois elas poderão ser o veículo de propagação e disseminação de microrganismos em áreas ainda não existentes (Carneiro, 1986).

### CONCLUSÃO

Fungos ocorrem tanto em glomérulos como em sâmaras de casuarina, mesmo após serem submetidos ao tratamento de assepsia como *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Alternaria* spp., *Pestalotiopsis* spp., *Phoma* spp. e *Colletotrichum* spp., indicando, possivelmente, que a transmissão ocorre de um para outro.

### AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de Produtividade em Pesquisa para Marlove Fátima Brião Muniz.

### REFERÊNCIAS

- AYIN, C. M. et al. 2015. Identification and characterization of bacteria associated with decline of ironwood (*Casuarina equisetifolia*) in Guam. **Australasian Plant Pathology**, **44**(2):225-234.
- BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. 1998. **Illustrated genera of imperfect fungi**. St. Paul, Minnesota: APS Press, 218p.
- CARNEIRO, J. S. 1986. Microflora associada a sementes de essências florestais. **Fitopatologia Brasileira**, **11**(3):556-557.
- DHINGRA, O. D. 2005. Teoria da transmissão de patógenos fúngicos por sementes. In: L. Zambolim (Ed.). **Sementes: qualidade fitossanitária**. Viçosa: UFV/ DFP, p. 75-104.
- DHINGRA, O. D. et al. 1980. **Tratamento de sementes (controle de patógenos)**. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, 121p.
- FANTINEL, V. S. et al. 2017. First Report of *Colletotrichum siamense* causing anthracnose on *Acca sellowiana* fruits in Brazil. **Plant Disease**, **101**(6):1035-1035.
- FANTINEL, V. S. et al. 2015. Tratamento de sementes de goiaba-serrana (*Acca sellowiana*): efeito na incidência de fungos e na germinação. **Revista Brasileira de Biociências**, **13**(2):84-89.

- FERREIRA, M. 2004. **Potencialidades de utilização da *Casuarina equisetifolia* em reflorestamentos**. Documentos/Embrapa Rondonia. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 13p.
- HENNIPMAN, H. S. et al. 2017. Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de araucária durante armazenamento. **Ciência Florestal**, 27(2):643-654.
- LI, Z. Y. et al. 2014. First Report of Foxtail Millet Seedling Damping-Off Caused by Binucleate *Rhizoctonia* AG-A in China. **Plant Disease**, 98(11):1587-1587.
- LIN, Y. et al. 2017. Wind and salt spray alter tree shape and dry mass density in *Casuarina equisetifolia* L. **Trees**, 31(1):15-26.
- MACHADO, J. C. 1988. **Patologia de sementes: fundamentos e aplicações**. Brasília: MECESAL-FAEPE, 106p.
- MENTEN, J. O. M. 1995. **Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico**. Piracicaba: ESALQ/FEALQ, 312p.
- MENTEN, J. O. M.; BUENO, J. T. 1987. Transmissão de patógenos por sementes. In: J. Soave; M. M. V. S. Wetzel (Ed.). **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, p.164-191.
- NAVAS, R. et al. 2016. Controle químico de *Marchantia polymorpha* em viveiro florestal. **Revista de Ciências Agroambientais**, 14(2):108-111.
- PÉREZ-HERNÁNDEZ, A. et al. 2014. Damping-off and root rot of pepper caused by *Fusarium oxysporum* in Almería province, Spain. **Plant Disease**, 98(8):1159-1159.
- PINHEIRO, C. G. et al. 2016. Efeito da assepsia superficial na germinação e incidência de fungos em sementes de espécies florestais. **Pesquisa Florestal Brasileira**, 36(87):253-260.
- POLETTTO, I. et al. 2015. Aspectos epidemiológicos da podridão-de-raízes da erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Ciência Florestal**, 25(2):281-291.
- POLETTTO, T. et al. 2015. First report of *Fusarium lacertarum* causing damping-off in *Casuarina equisetifolia* in Brazil. **Plant Disease**, 99(7):1040.
- Poletto et al., 2014. Fungos associados às flores e frutos da noqueira-pecã (*Carya illinoensis*). **Revista de Ciências Ambientais**, 8(1):05-13.
- SILVEIRA, A. L. da et al. 2016. Molecular characterization of *Colletotrichum* spp. isolates associated with post-bloom fruit drop. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 38(1):64-71.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. 2012. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 703 p.
- SU, D.; FU, J. F. 2013. First report of root rot on *Pulsatilla koreana* caused by *Fusarium oxysporum* in China. **Plant Disease**, 97(3):425-425.
- UY, M. M.; GARCIA, K. I. 2015. Evaluation of the antioxidant properties of the leaf extracts of Philippine medicinal plants *Casuarina equisetifolia* Linn, *Cyperus brevifolius* (Rottb) Hassk, *Drymoglossum piloselloides* Linn, *Ixora chinensis* Lam, and *Piper abbreviatum* Opiz. **Advances in Agriculture & Botany**, 7(2):71-79.
- WANG, F. et al. 2013. Biomass accumulation and carbon sequestration in four different aged *Casuarina equisetifolia* coastal shelterbelt plantations in south China. **Plos One**, 8(10):e77449.
- ZHANG, Y. et al. 2010. Improving drought tolerance of *Casuarina equisetifolia* seedlings by arbuscular mycorrhizas under glasshouse conditions. **New Forests**, 40(3):261-271.